

***In silico* und *in vitro* Screening von Proteinliganden zur Apoptoseinduktion**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Melanie Füllbeck
geb. am 09.06.1978 in Schwelm

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin: Prof. Dr. Dr. h.c. Ch. Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I: Prof. Dr. Ch. Limberg

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. C. Frömmel
2. Prof. Dr. P. Daniel
3. PD Dr. R. Preissner

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2007

*Our doubts are traitors,
And make us lose the good we oft might win,
By fearing to attempt.*

Aus: Measure for Measure,

William Shakespeare, 1603

ZUSAMMENFASSUNG

Die moderne Tumormedizin hat das Ziel die deregulierte Wachstumskontrolle und die Überlebensstrategien maligner Tumoren zu überwinden. Aufgrund der hohen Komplexität der onkogenen Transformation und Zellvermehrung steht hier eine Individualisierung therapeutischer Ansätze im Vordergrund. Mittels computerbasierter Methoden sollten hierzu in dieser Arbeit neue apoptoseinduzierende Substanzen gefunden und deren Wirksamkeit in späteren *in vitro* Experimenten überprüft werden.

In drei Modellprojekten konnten neue Substanzen identifiziert werden, die Apoptose in Tumorzellen induzieren. Im ersten Projekt wurden Inhibitoren der an das COP9 Signalosom (CSN-) assoziierten Kinasen CK2 und PKD mittels der Leitstrukturen Curcumin und Emodin gefunden. Die Zugabe dieser Inhibitoren zu den rekombinanten Kinasen oder dem aufgereinigten CSN führte zu einer Hemmung der Kinaseaktivität von PKD, CK2 und des aufgereinigten CSN-Komplexes. Nach der Zugabe zu Tumorzellen konnte eine Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 und einer Destabilisierung von c-Jun gegenüber einer Ubiquitin- und Proteasom-abgängigen Proteolyse in den untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Im zweiten Projekt wurde der Naturstoff Betulinsäure (betulinic acid, BA) bezüglich seines Wirkmechanismus untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die BA-induzierte Apoptose weitestgehend unabhängig von den pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, aber in Abhängigkeit von aktiven Caspasen, ausgelöst wird. Eine direkte Wirkung auf die Mitochondrien und die Auslösung einer Amplifikationsschleife, die zu einer Aktivierung von Bax/Bak führt und durch Bcl-2/Bcl-x_L inhibiert wird, kann die partielle Abhängigkeit in Bezug auf diese Mitglieder der Bcl-2-Familie erklären. Durch ein *in silico* Screening und die Verwendung eines neuen Eigenschaftsfilters konnten neuen BA-Analoga identifiziert werden. Zur Bewertung der Ergebnisse des *in silico* Screenings wurden die Daten des *National Cancer Institutes* (NCI) verwendet, die im Rahmen einer Suche mit über 40 000 Substanzen in 60 verschiedenen Tumorzelllinien erhoben wurden. Die Trefferquote und damit auch die Effizienz des *in silico* Screenings konnte, durch die Einführung dieses neuen Eigenschaftsfilters, verbessert werden. Im dritten Projekt wurden mittels *in silico* Screening, Docking-Experimenten und *in*

vitro Screenings zwei neue Bcl-2-Inhibitoren identifiziert, die derzeit in funktionellen Experimenten getestet werden.

Analysen des Proteins Bid, eines endogenen direkten Bax-Aktivators zeigten, dass durch den Einbau eines niedermolekularen, photoschaltbaren Moleküls an die Aminosäuren-Seitenketten des α -helikalen Peptides aus der BH3-Domäne von Bid eine gezielte Aktivierung der BH3-Domäne und damit auch eine gezielte Apoptoseinduktion in Tumorzellen ausgelöst werden kann.

Die effiziente Methode des *in silico* Screenings hat gezeigt, dass, durch ein systematisches Bewerten der virtuell erzielten Treffer, die Zeit und Kosten für die Suche nach Wirkstoffen reduziert werden können. Die gefundenen Treffer können als neue Leitstrukturen für weitere *in silico* Screenings ihre Verwendung finden oder mit Hilfe von Optimierungsprozessen in weitere Stufen der Entwicklung eintreten.

Schlagwörter: Apoptose, *in silico* Screening, *in vitro* Screening, Datenbanken, Apoptose-Assays, Zellkultur, Photoschalter

SUMMARY

Nowadays, cancer research is focused on the overcoming of survival strategies of malign tumors. Therapeutic approaches have to be individualised, due to the complexity of oncogene transformation and cell proliferation. In the present work, computer-based methods lead to the identification of novel apoptosis inducing molecules, whose potency should be validated in *in vitro* experiments.

Novel compounds, which induce apoptosis in cancer cells, could be identified on the basis of three projects. Inhibitors for the COP9 signalosome (CSN) associated kinases CK2 and PKD could be discovered using curcumin and emodin as lead compounds. The treatment of recombinant kinases, the purified CSN complex or tumor cells with the indicated inhibitors, led to the inhibition of kinase activity or the stabilisation of the tumorsuppressor p53 and the destabilisation of c-Jun towards the ubiquitin- and proteasome-dependent proteolytic degradation in different cell lines. Investigations concerning the mechanism-of-action of betulinic acid (BA) should give information about the function of the Bcl-2 protein family in the BA induced cell death. The experiments, which are focused on the mitochondrial signalling pathway, revealed that BA induces apoptosis in an almost independent manner with regards to the pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins, but dependent on the presence of activated caspases. A direct effect on the mitochondria and the initiation of an amplification-loop, which leads to an activation of Bax/Bak and can be inhibited by Bcl-2/Bcl-x_L, explains the partial dependence of BA induced apoptosis on the proteins of the Bcl-2 family. Via an *in silico* screening and the utilisation of a new property filter, novel BA analogues could be identified. For the first time, the data of the National Cancer Institute (NCI) is employed to evaluate results from the *in silico* screening. The data is collected during a cancer screen, which provides growth inhibition values for over 40 000 compounds in 60 tumor cell lines. The hit rate and the efficiency of the *in silico* screening could be improved by using this additional property filter. In the third project two novel Bcl-2 inhibitors have been identified via *in silico* screenings, docking experiments and *in vitro* screenings, which are performed at the moment.

The insertion of a photo-switchable compound to the amino acid side chain of an α -helical peptide from the pro-apoptotic protein Bid, an endogenous direct Bax activa-

tor, triggered the effect of a modulator, which results in a controllable activation and initiation of apoptosis in tumor cells.

In silico screenings as a reliable method corroborated that a systematical evaluation of the virtual hits could decrease the time and costs of experimental testings. The identified hits could serve as novel lead compounds for further *in silico* screenings or enter the next steps in the development of novel drugs using optimisation methods.

Keywords: Apoptosis, *in silico* Screening, *in vitro* Screening, databases, apoptosis-assays, cell culture, photo-switchable compounds

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
INHALTSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	1
1.1 GRUNDLAGEN UND ANWENDUNGEN DES <i>IN SILICO</i> SCREENINGS	1
1.2 ABLEITEN UND VERWENDEN VON LEITSTRUKTUREN	3
1.3 AUSWAHL DER MODELLPROJEKTE.....	4
1.3.1 Das COP9 Signalosom (CSN).....	6
1.3.2 Apoptose oder der „programmierte Zelltod“	9
1.3.3 Die Bcl-2-Proteinfamilie	15
1.4 AUSWAHL DER LEITSTRUKTUREN	18
1.4.1 CSN-Inhibitoren	18
1.4.2 Apoptoseinduktion durch den Naturstoff Betulinsäure	19
1.4.3 Bcl-2-Inhibitoren und Photoschalter	20
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 <i>IN SILICO</i> SCREENING.....	24
3.1.1 2D-Suchen.....	24
3.1.2 3D-Suche.....	25
3.1.3 Eigenschaftsfilter	27
3.1.4 Docking.....	29
3.1.5 Toxikologische Untersuchungen	32
3.1.6 NCI-Wirkprofile als neues Bewertungskriterium beim <i>in silico</i> Screening	32
3.2 MATERIALIEN.....	33
3.2.1 Primäre Antikörper für die Westernblot-Analyse.....	33
3.2.2 Sekundäre Antikörper für die Westernblot-Analyse	33
3.2.3 Verwendete Kleinstrukturen.....	34
3.2.4 Geräte.....	34
3.2.5 Verbrauchsmaterialien.....	36

3.2.6	Chemikalien.....	36
3.2.7	Puffer und Lösungen	38
3.2.8	Nährmedien	39
3.2.9	Kits.....	39
3.3	ZELLINIEN	39
3.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	41
3.4.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	41
3.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
3.4.3	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	42
3.4.4	Westernblot	42
3.4.5	Ponceau S-Färbung von Nitrozellulosemembranen.....	42
3.4.6	Kinaseassay (<i>in vitro</i>)	43
3.5	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	43
3.5.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	43
3.5.2	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität.....	44
3.5.3	MTT-Test.....	44
3.5.4	Durchflußzytometrie	44
3.5.5	Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$).....	45
3.5.6	Modifizierte Zellzyklusanalyse	46
3.5.7	Cytochrom c Freisetzung.....	46
3.5.8	Annexin-V-FITC / PI Doppelfärbung	47
3.5.9	Bestimmung der Anzahl Caspase-Aktivierung aufweisender Zellen	48
3.5.10	Bestimmung des intrazellulären c-Jun- und p53-Gehaltes.....	48
3.5.11	Aktivierung/Inaktivierung der BH3 Helix durch Bestrahlung	49
4	ERGEBNISSE	50
4.1	SIGNALOSOM INHIBITOREN	50
4.1.1	<i>In silico</i> Screening mit Curcumin und Emodin als Leitstruktur.....	50
4.1.2	Kinaseassay zur Bestimmung der inhibitorischen Wirkung der Treffer auf die CSN-assoziierten-Kinasen	55
4.1.3	Einfluss der Kinaseinhibitoren auf die Stabilität von c-Jun und p53	57
4.1.4	Effekt der Kinaseinhibitoren auf die Zellvitalität und die Auslösung von Apoptose	59
4.2	BETULINSÄURE-ANALOGA	64
4.2.1	Untersuchung des Wirkmechanismus der Betulinsäure.....	64

4.2.2	<i>In silico</i> Screening mit Betulinsäure als Leitstruktur	74
4.3	BCL-2-INHIBITOREN UND PHOTOSCHALTER.....	82
4.3.1	<i>In silico</i> Screening mit BH3I-1 und BH3I-2 als Leitstrukturen	82
4.3.2	Docking der Treffer aus dem <i>in silico</i> Screening	84
4.3.3	Gezielte Apoptoseinduktion durch Photoschalter	87
5	DISKUSSION.....	91
5.1	NEUE KINASEINHIBITOREN INDUZIEREN APOPTOSE IN TUMORZELLEN UND HEMMEN DIE ANGIOGENESE	91
5.2	BETULINSÄURE LÖST APOPTOSE UNABHÄNGIG VON DEN PROTEINEN DER BCL-2-FAMILIE AUS	94
5.3	IDENTIFIZIERUNG NEUER BETULINSÄURE-ANALOGA DURCH DEN VERGLEICH MIT BEKANNTEN GI ₅₀ PROFILEN	97
5.4	<i>IN SILICO</i> IDENTIFIZIERUNG NEUER BCL-2-INHIBITOREN UND EINES NIEDERMOLEKULAREN BAX-AKTIVATORS	100
5.5	LICHTINDUZIERT UND GEZIELTE APOPTOSEINDUKTION DURCH EINE SCHALTBARE BH3 HELIX	102
5.6	ERSTELLUNG EINER NATURSTOFFDATENBANK	104
6	AUSBLICK	109
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	110
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	113
	TABELLENVERZEICHNIS.....	115
	LITERATURVERZEICHNIS	116
	ANHANG.....	130
	DANKSAGUNG	133
	LEBENS LAUF	135
	EIGENE PUBLIKATIONEN	137
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	139

1 EINLEITUNG

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts kam es im Bereich der Wirkstoffentwicklung zu einem starken Wandel. War in früheren Zeiten die Entdeckung neuer Arzneimittel durch glückliche Zufälle geprägt, wie zum Beispiel bei der Entdeckung des ersten fiebersenkenden Mittels Acetanilid [1], des Antibiotikums Penicillins [2], der psychotropen Droge Lysergsäurediethylamid (LSD) [3] und des ersten Tranquilizers Chlordiazepoxid (Psychopharmakon mit angstlösender und entspannender Wirkung, [4], Handelsname: Librium®), so ist heute durch die genombasierte Forschung, Hochdurchsatz-Testmodelle, Protein-3D-Strukturen und neue computer-gestützte Entwürfe von Wirkstoffen ein rationales Design möglich [5, 6]. Virtuelle Datenbanken mit potentiellen neuen Wirkstoffen erleichtern und beschleunigen hierbei die Entwicklung von neuen Medikamenten [7]. Die Suche in diesen Datenbanken wird als *in silico* Screening bezeichnet. An diese Suche schließen sich experimentelle Versuche (*in vitro* Screening) zur Verifizierung der Ergebnisse an.

1.1 GRUNDLAGEN UND ANWENDUNGEN DES *IN SILICO* SCREENINGS

Durch die Entwicklung des *in silico* Screenings hat in der Medikamentenentwicklung ein Wandel stattgefunden, der zur effizienteren und kostengünstigeren Identifizierung von neuen Wirkstoffen beigetragen hat [7]. Experimentell durchgeführte Hochdurchsatzmethoden erfordern den Einsatz von tausenden Substanzen, die in aufwendigen, zeitintensiven Versuchen bezüglich ihrer biologischen Aktivität getestet werden [8]. Im Gegensatz dazu wird bei *in silico* Screenings eine Vorauswahl der zu testenden Substanzen getroffen, wodurch die Anzahl der experimentellen Versuche und die damit verbundene Zeit reduziert werden.

Bei der Durchführung der computerbasierten Suchen werden sowohl die chemischen (2D-), als auch die räumlichen (3D-) Eigenschaften der niedermolekularen Strukturen berücksichtigt. In großen Datenbanken sind synthetische und natürliche Kleinstrukturen und, in den meisten Fällen, die dazugehörigen Konformere, durch die alle möglichen spezifischen Anordnungen der Atome eines Moleküls im dreidimensionalen

Raum beschrieben werden, gespeichert. Zur Suche in diesen Datenbanken werden jeweils Leitstrukturen verwendet, deren Bindung an das Zielprotein oder deren biologische Aktivität bereits bekannt ist [9]. Die Berechnung der chemischen Ähnlichkeit zwischen Leitstruktur und der Substanzen in der Datenbank erfolgt über Fingerprints, in denen die An- und Abwesenheit von funktionellen Gruppen eines Moleküls dokumentiert wird und mit anderen Molekülen verglichen werden kann (Abb. 1) [10, 11, 12].

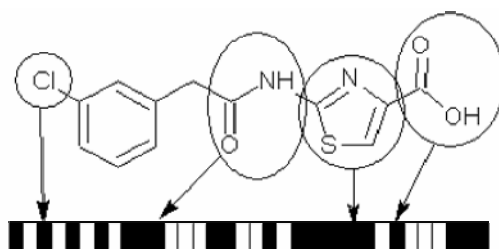


Abbildung 1: Fingerprint einer Kleinstruktur.

Die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Strukturmerkmale wird in ein Bitmuster übersetzt [13, 14].

Zur Bestimmung der räumlichen Ähnlichkeit von zwei Molekülen wurde ein Suchalgorithmus [15] verwendet, der die bestmögliche strukturelle Überlagerung der Leitstruktur und der Kleinstrukturen in der Datenbank berechnet. Durch die Suche im „näheren strukturellen Umfeld“ der Leitstrukturen weisen die gefundenen Moleküle, neben ähnlichen physikochemischen Eigenschaften, im günstigsten Fall auch eine ähnliche biologische Aktivität auf. Dieser Vergleich basiert auf dem „similar compounds display similar properties“-Prinzip [16]. Jedoch ermöglicht die Kombination aus 2D- und 3D-Suchen nicht nur das Auffinden von strukturell und chemisch sehr ähnlichen Molekülen, sondern auch die Identifizierung von so genannten „scaffold hoppers“, die von dem Grundgerüst der Leitstruktur abweichen, aber durch die räumliche Ähnlichkeit als viel versprechende Treffer gelten [17, 18].

Durch die Verwendung von Eigenschaftsfiltern, welche die Treffer des *in silico* Screenings auf ihre Aufnahmemöglichkeit in den Körper (**A**bsorption), Verteilung im Körper (**D**istribution), Metabolisierung (**M**etabolismus), sowie Ausscheidung (**E**xkretion, kurz ADME) bewerten, wird die Anzahl der auf Wirkung zu testenden Substanzen nochmals reduziert [19, 20].

Das *National Cancer Institute* (NCI) der USA hat im Rahmen eines Projektes mehr als 40 000 Substanzen an 60 verschiedenen humanen Tumorzelllinien getestet. Für jede niedermolekulare Substanz wurde ein Zytotoxizitätswert ermittelt, bei dem das Wachstum von 50 % der Zellen inhibiert ist (*growth inhibition* 50, GI₅₀-Wert) [21]. Diese Werte können, beim strukturellen Vergleich mit Treffern aus dem *in silico* Screening, weitere Hinweise auf die mögliche biologische Aktivität der Kleinstruktur geben.

Durch diesen umfangreichen Datensatz des NCI kann zur Bewertung der Ergebnisse der virtuellen Suche ein neues Kriterium hinzugefügt werden, was zu einer verbesserten Abschätzung der Erfolgsquoten beitragen kann.

1.2 ABLEITEN UND VERWENDEN VON LEITSTRUKTUREN

Die Suche nach neuen Wirkstoffen ist äußerst wichtig für den Kampf gegen alte und neue Krankheiten. Im Laufe des letzten Jahrhunderts hat sich die Suche nach neuen, und die Optimierung bereits existierender Wirkstoffe, jedoch stark gewandelt. War man früher auf das alleinige Wissen über Wirkstoffe aus Pflanzen und Tieren angewiesen, so ist es heute möglich, mittels kombinatorischer Chemie große virtuelle und reelle Datenbanken mit synthetischen Molekülen zu entwickeln.

Die Leitstrukturen sind Substanzen aus der Natur oder synthetische Moleküle, welche die gewünschte Wirkung zeigen, aber aus verschiedensten Gründen noch nicht therapeutisch einsetzbar sind. Für die moderne Wirkstoffforschung ist die Suche nach solchen Leitstrukturen und das Auffinden von geeigneteren niedermolekularen Substanzen von sehr großer Bedeutung.

Abhängig von dem jeweiligen Modellprojekt ist das Auffinden von Leitstrukturen durch verschiedene Ansätze möglich. Im Bereich der Krebsforschung wurde in den letzten Jahren viel Zeit und Geld darauf verwendet, Substanzen zu finden, die eine zelltodfördernde oder Angiogenese-hemmende Wirkung haben. Diese Substanzen können als Leitstruktur für *in silico* Screenings verwendet werden und zum Auffinden von effektiveren Wirkstoffen führen.

Sollte keine Leitstruktur für ein bestimmtes Target (Zielprotein) vorhanden sein, so können, bei Kenntnis über das aktive Zentrum und die 3D-Struktur der Zielstruktur,

ein oder mehrere Pharmakophore (Leitstrukturen) anhand der Lage der Atome abgeleitet werden. Diese Pharmakophore bestehen aus einer definierten räumlichen Anordnung von funktionellen Gruppen. Mit diesen Vorgaben wird dann eine virtuelle Suche durchgeführt und die Moleküle, die über diese Anordnung der funktionellen Gruppen verfügen, werden *in vitro* auf Wirksamkeit getestet. [22]

In der vorliegenden Arbeit werden Substanzen mit bereits bekannter biologischer Wirkung als Leitstrukturen verwendet. Im Fokus stehen niedermolekulare Substanzen, die den Zelltod in Krebszellen fördern.

1.3 AUSWAHL DER MODELLPROJEKTE

Das statistische Bundesamt führt Krebs als die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen an [23]. Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. hat in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut im Juni 2006 eine Schätzung für die Anzahl der Krebsneuerkrankungen für das Jahr 2002 herausgegeben (Abb. 2). 424.250 Krebsneuerkrankungen (Männer 218.250, Frauen 206.000) sind registriert, was einen Anstieg von 29.600 Erkrankungsfällen im Vergleich zum Jahr 2000 bedeutet [24].

Prozentualer Anteil an der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2002
Männer n= 218.250, Frauen n= 206.000

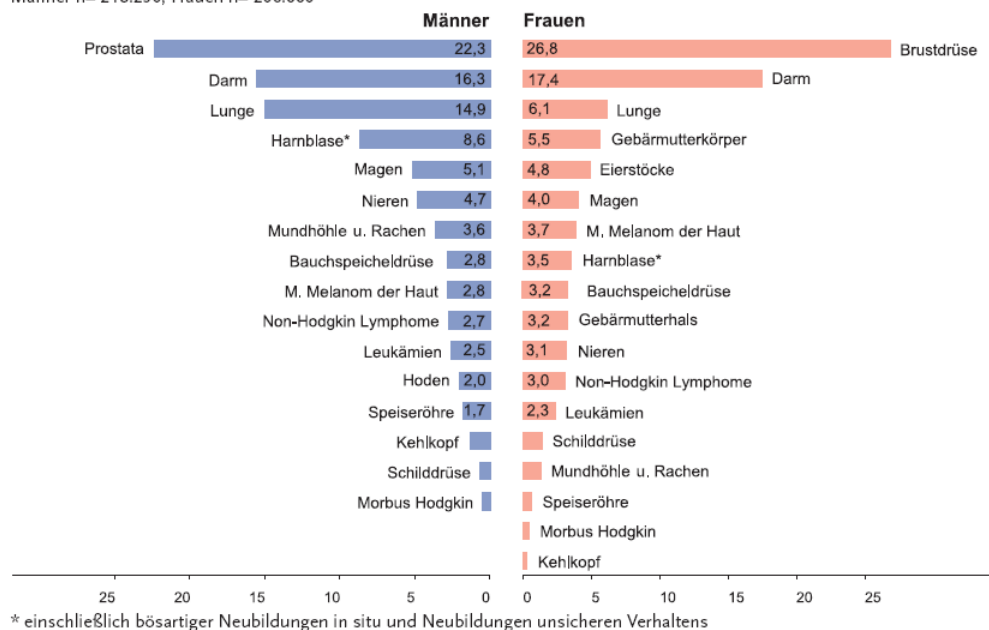


Abbildung 2: Anzahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2002.
(Abbildung aus [24]).

Je größer der Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung ist, desto höher ergibt sich insgesamt die Krebshäufigkeit. Durch Altersstandardisierung wird sichergestellt, dass Unterschiede im Altersaufbau der verglichenen Bevölkerungen nicht allein die Unterschiede der Krebshäufigkeit verursachen. Die für Deutschland alterskorrigierten Werte zeigen, dass in den letzten 20 Jahren eine Zunahme der Krebsneuerkrankungen von 20 % bei Männern und 36 % bei Frauen zu verzeichnen ist (Altersgruppe 0-44 Jahre; Abb. 3). Diese Zahlen belegen die enorme volkswirtschaftliche Relevanz der Suche nach neuen, wirksamen Tumorthérapeutika, auch wenn die diagnostischen Verfahren und die Krebsfrüherkennung in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht haben. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit neue niedermolekulare Substanzen identifiziert werden, die als potentielle Krebstherapeutika in Frage kommen.

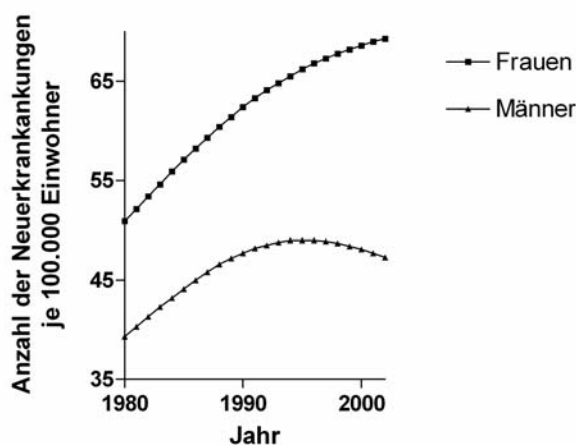


Abbildung 3: Darstellung der altersstandardisierten Erkrankungsrate je 100 000 Bewohner für Frauen und Männer.

Die dargestellten Werte wurden auf die Europabevölkerung altersstandardisiert und für die Region Deutschland angegeben. Die Werte sind für den Zeitraum von 1980 – 2002 und die Altersgruppe von 0 – 44 Jahre zusammengestellt.

Die Modellprojekte sollen zum Auffinden von apoptoseinduzierenden (zelltodfördernden) Substanzen dienen. Im Folgenden werden die Hintergründe zu den Projekten beschrieben:

1.3.1 Das COP9 Signalosom (CSN)

Das CSN wurde 1998 während einer Präparation vom 26S Proteasom aus Erythrozyten isoliert [25]. Es enthält acht Untereinheiten (Abb. 4) und weist eine Ähnlichkeit zum Lid-Subkomplex des 26S Proteasoms auf. Da die zuvor bekannten Proteine Jab1 [26] und Trip15 [27] als Komponenten des Komplexes identifiziert wurden, wurde zuerst der Name „Jab1-containing signalosome“ gewählt, welcher aber seit 1999 durch die einheitliche Bezeichnung COP9 (constitutive photomorphogenic gene 9) Signalosom (CSN) in der Literatur ersetzt wurde [28].

CSN

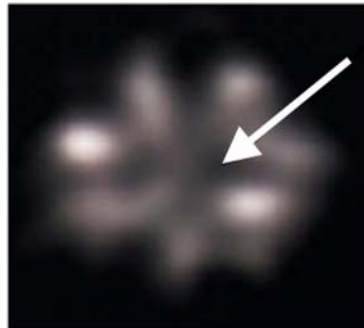


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme des CSN.

Deutlich zu erkennen ist die ungleichmäßige Anordnung der acht Untereinheiten und die durch den Pfeil gekennzeichnete zentrale Furche [29].

Die acht Untereinheiten des CSN sind nach abnehmendem Molekulargewicht CSN1-CSN8 benannt [28]. Von *A. thaliana* bis zum *H. sapiens* ist die Zusammensetzung der Untereinheiten hoch konserviert [30]. Die beiden Untereinheiten CSN5 und CSN6 weisen N-terminal eine MPN (Mpr1-Pad1-N-terminal)-Domäne auf, wohingegen die übrigen Untereinheiten eine PCI (Proteasome, COP9 signalosome, initiation factor-3)-Domäne im C-terminalen Ende aufweisen [31]. In PCI-Komplex-unabhängigen Proteinen, sowie in Prokaryoten, wird die MPN-Domäne ebenfalls gefunden. Ein sogenanntes MPN⁺- oder JAMM-Motiv konnte innerhalb der MPN-Domäne einiger Proteine lokalisiert werden. Das Motiv konnte nur in CSN5, nicht jedoch in CSN6 identifiziert werden [32]. Die Deneddylierungsaktivität von CSN5 wurde diesem Motiv zugeordnet [33]. Das aktive Zentrum wird dabei durch zwei Histidine, ein Aspartat sowie ein Glutamat gebildet, welche ein Zinkion komplexieren. Die PCI- oder PINT (Proteasome subunits, Int-6, Nip-1, and Trip15)-Domäne [34] besteht aus zahlreichen α -Helices und scheint für die Interaktion der CSN-Untereinheiten miteinander notwendig zu sein [35]. Eine Aufgabe dieser Domäne bei der Assemblierung des Komplexes und assoziierter Proteine wäre somit möglich. Neuere Daten weisen jedoch darauf hin, dass noch weitere Bereiche in den Proteinen für die Wechselwirkung verantwortlich sein müssen, da die PCI-Domäne alleine für den Komplexaufbau nicht ausreichend ist [36].

Neben den Interaktionen der CSN-Untereinheiten miteinander, sind auch zahlreiche Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beschrieben. Die bisher bekannten interagierenden Proteine sind in Abbildung 5 neben der jeweiligen CSN-Untereinheit dargestellt.

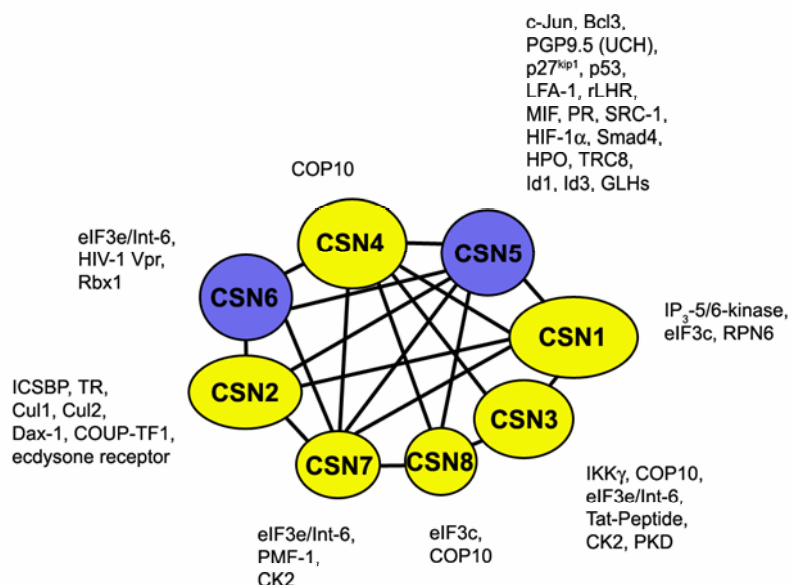


Abbildung 5: Darstellung der bisher identifizierten Interaktionspartner des CSN. Durch Querverbindungen sind die Interaktionen der Untereinheiten miteinander dargestellt. An der jeweiligen Untereinheit stehen die assoziierten Proteine. Gelb: PCI-Domäne, blau: MPN-Domäne (Abbildung aus [37])

1.3.1.1 Kinaseaktivität des CSN

Durch die in Abbildung 5 dargestellten assoziierten Enzyme Inositol-1,3,4-triphosphat-5/6-Kinase (IP₃-5/6-Kinase), Caseinkinase 2 (CK2) und Proteinkinase D (PKD/PKC μ) besitzt das CSN Kinaseaktivität [38, 39]. Die Bindung der IP₃-5/6-Kinase an das CSN findet direkt an CSN1 statt, wobei der wahrscheinlichste Bindungspartner für die CK2 und PKD CSN3 ist. Eine zusätzliche Wechselwirkung der CK2 findet mit CSN7 statt.

Es sind mehr als 300 Substrate bekannt, die von der CK2, welche in der ganzen Zelle vorkommt, phosphoryliert werden [40]. Die PKD ist eine Serin/Threonin-Kinase, die in der Plasmamembran oder dem Zytosol von Lymphozyten lokalisiert ist [41] und mit

einer Vielzahl von zellulären Funktionen, wie Golgi-Organisation, Apoptose und Zellproliferation assoziiert wird [42]. Das CSN dient hierbei als Plattform, welche die Kinasen und die dazugehörigen Substrate zusammenbringt [43].

Eine CSN-vermittelte Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 am Thr155 durch die assoziierten Kinasen begünstigt den Abbau durch das 26S Proteasom [44], wohingegen eine CSN-vermittelte Phosphorylierung im N-terminalen Bereich von c-Jun zu einer Stabilisierung des Proteins führt und somit die AP1-Transaktivierungsaktivität steigert [25]. Durch dieses zelluläre Proto-Onkogen wird die Zellproliferation und auch die Angiogenese gefördert [45].

Zelluläre Funktionen, wie die Regulation der Transkription, Reparatur der DNA, Zellzyklusregulation und Apoptose werden sowohl von p53, als auch von c-Jun kontrolliert. Hierbei fungiert der Wildtyp von p53 als wichtiges Tumorsuppressororgan, welches die Entstehung von Tumoren hemmt [46]. Einer der am häufigsten beobachtete Defekt während der Tumorgenese oder der Tumorprogression ist eine Mutation im p53 Gen [47]. Daher ist die intrazelluläre Konzentration von p53 und c-Jun äußerst bedeutend für die Tumorentwicklung. Die Kontrolle der Stabilität dieser Schlüsselpoteine ist somit von großem Interesse in der Tumorthherapie. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Inhibition der CSN-abhängigen Phosphorylierung zu einem Anstieg des intrazellulären Spiegels von p53 [44] und zu einem Abfall der c-Jun-Konzentration [48] führt.

1.3.2 Apoptose oder der „programmierte Zelltod“

Die Anzahl der Zellen in verschiedenen Geweben wird durch Zellmigration, Zellteilung und Zelltod bestimmt [49]. Der programmierte Zelltod spielt eine wesentliche Rolle in der Embryonalentwicklung, weil dieser zu definierten Zeitpunkten in den zu eliminierenden Gewebsarealen ausgelöst wird (Abb. 6) und somit einen entwicklungsbiologischen Prozess darstellt [50].

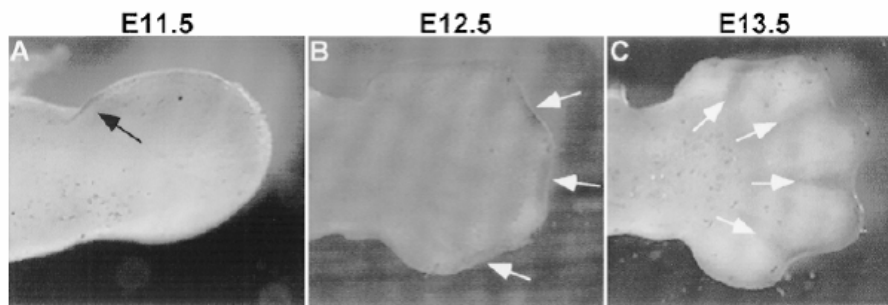


Abbildung 6: Zelltod bei der Extremitätenentwicklung der Maus.

A Extremitätenknospe (Tag E11.5), Zelltod in der anterioren nekrotischen Zone (ANZ). **B** Extremitätenknospe (Tag E12.5), Zelltod ist in der apikalen ektodermalen Randleiste (AER) sichtbar. **C** Extremitätenknospe (Tag E13.5), Zelltod im interdigitalen Mesenchym. Nilblaufärbung (Abbildung aus [51]).

Die von Clarke & Clarke unterschiedenen vier Zelltodformen Apoptose, Autophagie, mitotische Katastrophe und Nekrose [52] sind dagegen vorwiegend morphologisch und zum Teil auch biochemisch definiert. Die Apoptose ist hierbei der am besten untersuchte Mechanismus [50]. Durch Kerr, Wyllie und Currie wurde der Begriff der Apoptose für den programmierten Zelltod erstmals 1972 eingeführt [53]. Während der Ontogenese ist die Apoptose beispielsweise für die Entwicklung des Linsenauges essentiell, da durch den apoptotischen Zelltod der Zellen von Glaskörper und Linse die Lichtdurchlässigkeit der Augenlinse erreicht wird [54]. Im adulten Organismus werden gealterte oder geschädigte Zellen in der Haut und in Schleimhäuten aus dem Gewebsverband ebenfalls durch Apoptose entfernt [55]. Weiterhin werden Zellen, die durch Wachstumsfaktorentzug oder Überproduktion von aberranten Proteinen gestresst sind, abgebaut. Eine gestörte Zellproliferation, ausgelöst durch die Aktivierung von Onkogenen oder Tumorsuppressoren, führt ebenfalls zur Induktion von Apoptose.

Nachdem festgestellt wurde, dass die Apoptose einem genetisch determinierten Regulationsmechanismus unterliegt [56, 57], und dass Abnormalitäten in der Regulation des Zelltodes zu Krankheiten wie Krebs [58, 59] und Autoimmunkrankheiten [60, 61, 62, 63] führen können, bekam die Erforschung dieser Prozesse eine enorme Bedeutung für die Medizin.

Im Allgemeinen wird die Apoptose in zwei Signalwege unterteilt. Der extrinsische Weg (Abb. 7) wird durch Todesrezeptoren ausgelöst, die an der Zelloberfläche lokalisiert

siert und durch extrazelluläre, Cystein-reiche Domänen (CRDs) charakterisiert sind. Sie gehören zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) [64]. Die am besten charakterisierten Todesrezeptoren sind TNFR1 (p55 oder CD120a), CD95 (Apo1 oder Fas), DR4 und DR5, von denen jeder eine einzelne Todesdomäne im intrazellulären Kompartiment besitzt, die für die Rekrutierung von Adapterproteinen wie FADD und TRADD verantwortlich sind [65]. Die Bindung der entsprechenden Todesliganden (z.B. CD95/Fas Ligand) an die Rezeptoren induziert eine Oligomerisierung der Todesrezeptoren, wodurch auch die Bindung der Adapterproteine vermittelt wird. Durch die an den Rezeptor assoziierten Adapterproteine können weitere Effektormoleküle der Apoptose (z.B. Interaktion zwischen den Adapterprotein FADD und Procaspase-8) gebunden werden, welche dann in diesem todesinduzierenden Komplex (death-inducing signaling complex, DISC) aktiviert werden und weitere Phasen des Zelltods einleiten [66].

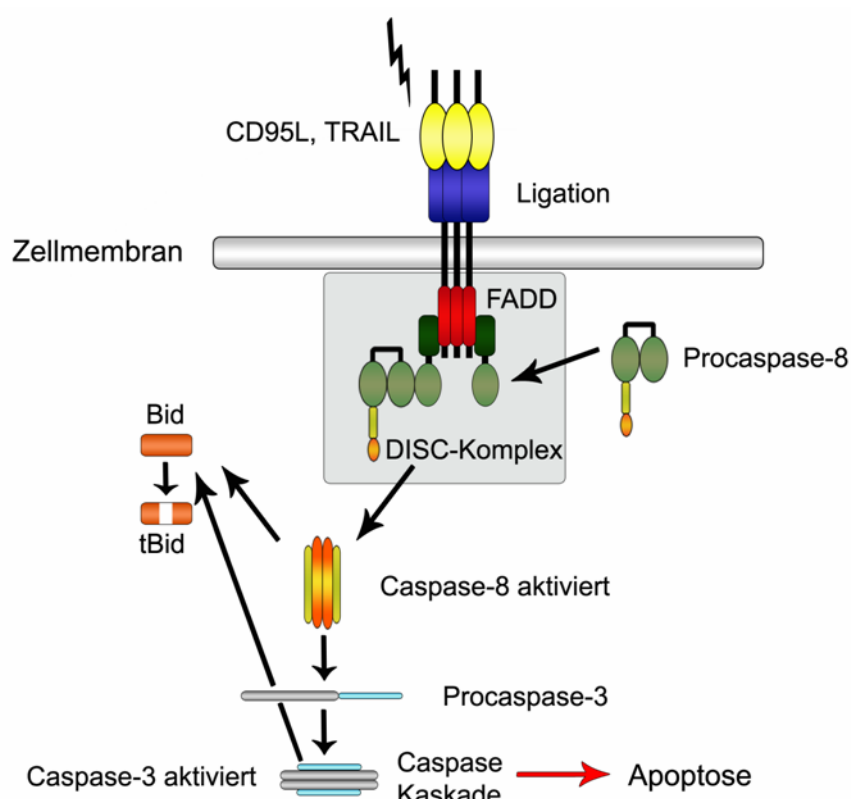


Abbildung 7: Darstellung des extrinsischen Apoptoseweges.

Der extrinsische Apoptoseweg wird durch Todesrezeptoren wie CD95 und deren Liganden (z.B. CD95L) aktiviert. Durch die Oligomerisierung des Rezeptors und die Bindung von Adapterproteinen (z.B. FADD) werden weitere Effektormoleküle (z.B. Procaspase-8) in diesen todesinduzierenden Komplex (DISC-Komplex) eingebunden und aktiviert, was zur Auslösung der Caspase-Kaskade und Exekution der Apoptose führt. Die Caspase-8 und -3 vermittelte Spaltung von Bid aktiviert im Folgenden den intrinsischen Apoptoseweg (modifiziert nach [67]).

Ein zweiter Signalweg der Apoptose ist der intrinsische Weg, der durch die Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie kontrolliert wird (Abb. 8). Sie spielen eine Schlüsselrolle in der durch die Mitochondrien regulierten Apoptose [68]. Die Bcl-2-Familienmitglieder liegen, abhängig vom Vorhandensein einer Transmembrandomäne und dem Aktivierungszustand des Proteins, als zytosolische oder membranassoziierte Proteine vor [69]. Mehr als zwei Dutzend Proteine, die zu dieser Genfamilie gehören, wurden bereits identifiziert [70, 71]. Auf der Basis von Funktion und Sequenzähnlichkeit werden die Bcl-2-Proteine in drei Subfamilien unterteilt [69].

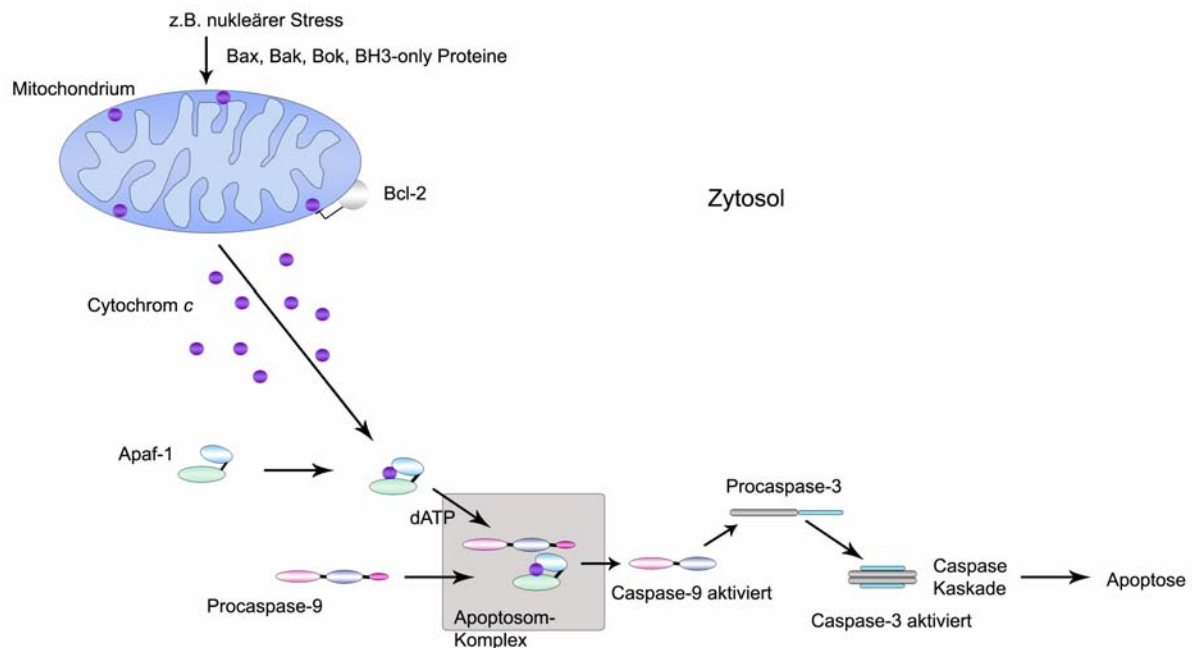


Abbildung 8: Darstellung des intrinsischen Apoptoseweges.

Der intrinsische Apoptoseweg kann über die Stabilisierung des Proteins p53 ausgelöst werden, z.B. nach Aktivierung von nukleären Stressreaktionen. Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien wird durch die anti-apoptotischen (z.B. Bcl-2) und pro-apoptotischen (Multidomänen-Bcl-2-Homologe Bax und Bak, sowie BH3-only Proteine) Bcl-2-Familienmitglieder reguliert. Nach seiner Freisetzung bindet das nun zytosolische Cytochrom c an das Adapterprotein APAF-1 (Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1), was in der Bildung des APAF-1-Caspase-9-Apoptosom-Komplexes resultiert. Die Initiator-Caspase-9 wird in diesem Komplex aktiviert und aktiviert wiederum durch proteolytische Spaltung die Effektor-Caspase-3 (sowie -6 und -7 (nicht gezeigt)), was zur Exekution der Apoptose führt (modifiziert nach [67]).

Die erste Gruppe wird hauptsächlich durch die Vertreter Bcl-2 und Bcl-x_L repräsentiert. Diese anti-apoptotisch wirkenden Familienmitglieder enthalten die vier α -helikalen Bcl-2 Homologie-Domänen 1 bis 4, durch die die Interaktion mit den anderen Subfamilien der Bcl-2-Proteinfamilie vermittelt wird [69]. Die pro-apoptotischen Vertreter dieser Genfamilie werden in die Multidomänen-Bax-homologen-Proteine, wie Bax, Bak und Bok, sowie weiteren Multidomänen-Proteine und die Familie der BH3-only Proteine unterteilt, wobei die Bax-homologen Proteine die Domänen BH1, BH2, BH3 und eine Transmembrandomäne besitzen, während die BH3-only Proteine nur über die zelltodfördernde BH3-Domäne und zum Teil über eine Transmembran-

domäne verfügen. Die anderen Multidomänen-Proteine enthalten zwei oder mehrere der BH-Domänen, sowie teilweise eine Transmembrandomäne [69, 72] (Abb. 9). Durch spezifische Interaktionen zwischen den zelltodfördernden und zelltodhemmenden Vertretern dieser Familie wird das Zusammenspiel reguliert (vgl. Kapitel 1.3.3) [73].

Durch Überexpression von Bcl-2 oder dessen anti-apoptotischen Homologen wird der Zelltod durch Apoptose gehemmt und die nachgeschaltete Aktivierung von Effektormechanismen der Apoptose blockiert, was die Tumorentstehung begünstigt [57, 58, 74]. Auch der Verlust von Bax [75] oder die Inaktivierung von BH3-only Proteinen ist an der malignen Transformation von Tumorzellen beteiligt [76, 77]. Die Inhibition dieses Signalweges ist vielversprechend für einen therapeutischen Ansatz.

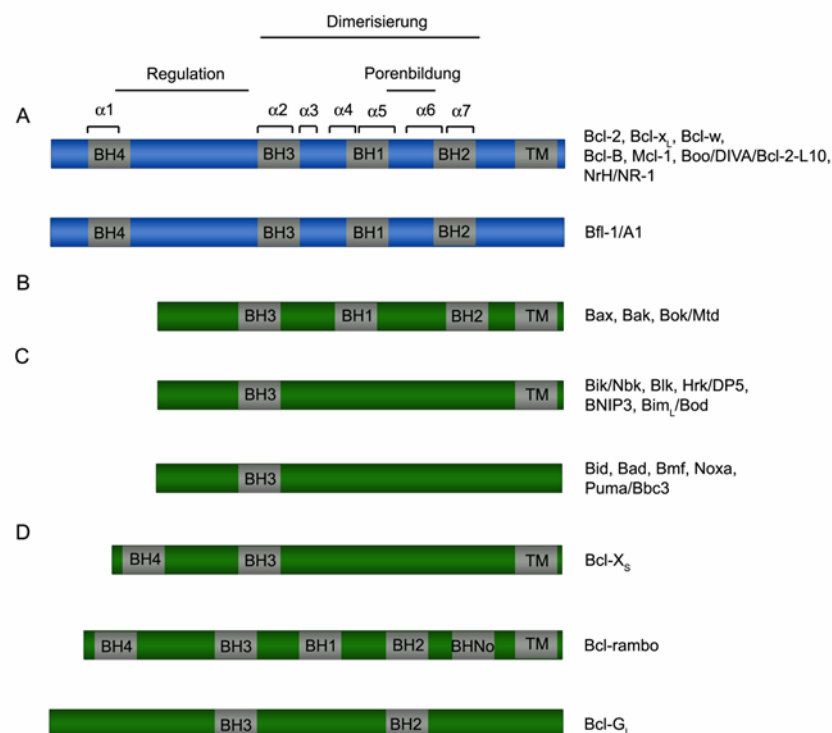


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Bcl-2-Familienmitglieder nach struktureller und funktioneller Klassifizierung in Säugern.

Blau: anti-apoptotische Familienmitglieder, grün: pro-apoptotische Familienmitglieder. α: α-Helix, TM: Transmembrandomäne, BH1-BH4: Bcl-2 Homologie-Domänen 1-4. **A:** Bcl-2-Subfamilie, **B:** Bax Subfamilie, **C:** BH3-only Subfamilie, **D:** Multidomänen-Proteine. (modifiziert nach [78]).

1.3.3 Die Bcl-2-Proteinfamilie

Die Unterteilung der Bcl-2-Familie in die anti- und pro-apoptotischen Proteine wurde bereits in Kapitel 1.3.2 (Apoptose oder der „programmierte Zelltod“) beschrieben. Im Folgenden soll das Zusammenspiel innerhalb dieser großen Proteinfamilie näher beschrieben werden. Auch wenn den verschiedenen Vertretern alternative Funktionen in gesunden Zellen zugeschrieben werden, so können sie doch alle dem mitochondrialen Apoptose-Signalweg zugeordnet werden [79].

Die genaue Interaktion zwischen den Proteinen der Bcl-2-Familie ist noch nicht abschließend geklärt. Es werden verschiedene Modelle beschrieben. Die bekanntesten Modelle sind das Aktivator-Modell [80], das Letai-Modell [81] und das Inhibitor-Modell [82]. Bei dem so genannten Aktivator-Modell werden die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak direkt durch eine Gruppe der BH3-only Proteine (tBid, Bim und Puma, „Aktivatoren“) aktiviert (Abb. 10), was zur Apoptoseinduktion führt. Die Kontrolle dieser BH3-only Proteine unterliegt den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Proteinfamilie (Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1) (Abb. 10).

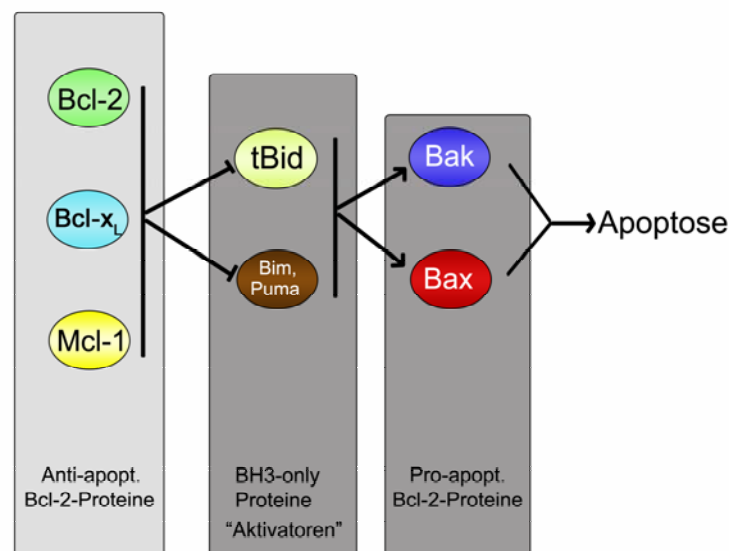


Abbildung 10: Aktivator-Modell zur Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie.

Die BH3-only Proteine („Aktivatoren“) aktivieren direkt die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak, wodurch Apoptose ausgelöst wird. Die Kontrolle dieser BH3-only Proteine unterliegt den anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern (Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1)[80].

Ein zweites Modell, das so genannte Letai-Modell, ist eine Erweiterung des Aktivator-Modells. Es wird eine direkte Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak durch tBid, Bim und Puma beschrieben. Wie bei dem Aktivator-Modell stehen hierbei diese aktivierenden BH3-only Proteine unter der Kontrolle von Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1. Diese Kontrolle kann durch die Gruppe der „Inhibitoren“, die zu den BH3-only Proteinen gehören, aufgehoben werden, da diese durch die Bindung an die anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder eine Freisetzung der „Aktivatoren“ (tBid, Bim und Puma) herbeiführen (Abb. 11).

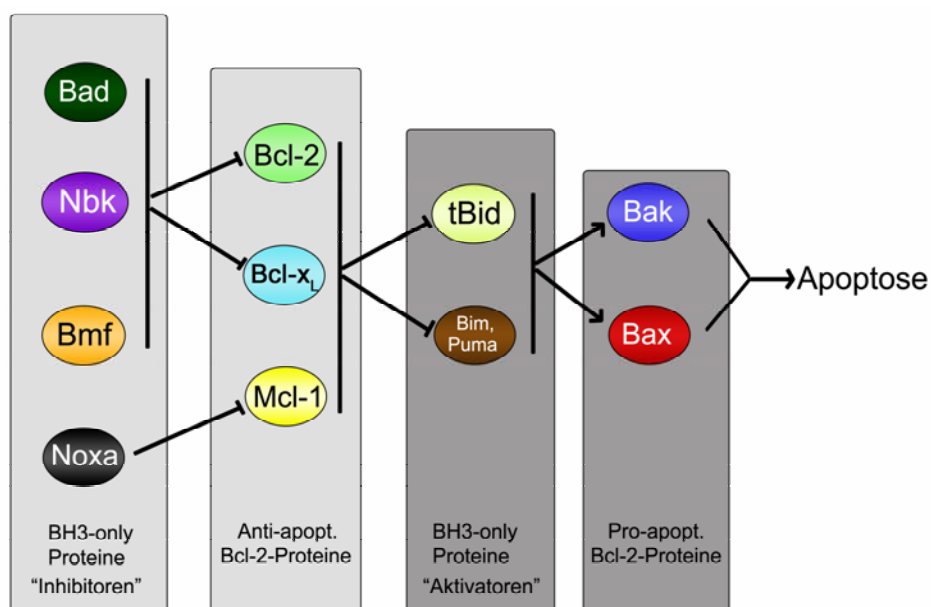


Abbildung 11: Letai-Modell zur Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie.

Die selektive Bindung der BH3-only Proteine (Bad, Nbk, Bmf und Noxa; „Inhibitoren“) an die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1 führt zur Freisetzung der „Aktivatoren“ (tBid, Bim und Puma). Diese BH3-only Proteine aktivieren die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak, wodurch Apoptose induziert wird [81].

Im Gegensatz zum Letai-Modell geht das Inhibitor-Modell davon aus, dass die BH3-only Proteine (Bad, Blk, Bmf, tBid, Bim, Puma und Noxa) die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w und Mcl-1 sequestrieren können. Dadurch wird der hemmende Einfluß auf die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak aufgehoben, wodurch es zur Induktion von Apoptose kommt (Abb. 12).

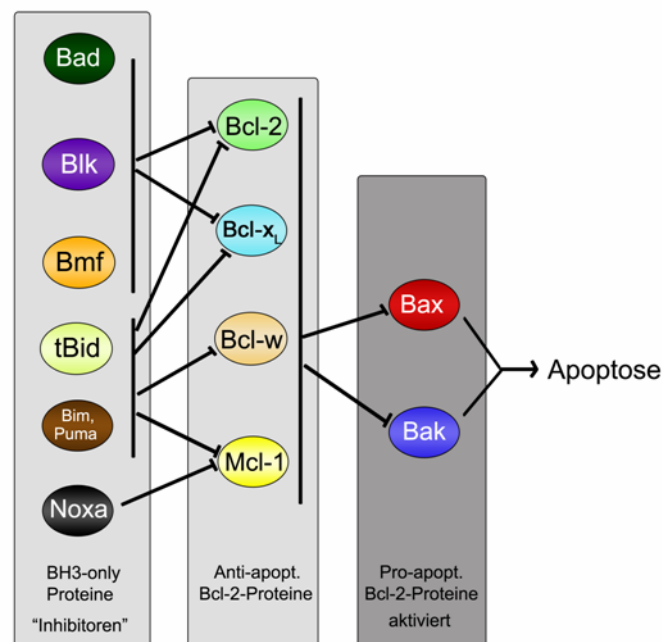


Abbildung 12: Inhibitor-Modell zur Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie.

Die BH3-only Proteine (Inhibitoren) hemmen die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w und Mcl-1. Dadurch werden die sequestrierten pro-apoptotischen Proteine frei und die Apoptoseinduktion folgt [82].

Eine direkte Aktivierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak durch die BH3-only Proteine wird bei dem Inhibitor-Modell nicht beschrieben. Hierbei wird von einer Auto-Aktivierung der ansonsten streng kontrollierten Proteine Bax und Bak ausgegangen.

Nach der Aktivierung findet in der Mitochondrienmembran eine Oligomerisierung von Bax und/oder Bak statt [83]. Daraufhin öffnen sich Kanäle und setzen Cytochrom c aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran frei [84]. Dieses zytosolische Cytochrom c, ATP und das zytosolische APAF-1 Adapterprotein bilden gemeinsam mit der Procaspase-9 das Apoptosom [85]. Mindestens zwei Procaspase-9 Zymogene werden in engen räumlichen Kontakt gebracht und autokatalytisch aktiviert [86]. Die Procaspase-9 gehört zur Familie der Caspasen, die als Zymogene (inaktive Vorstufen des aktiven Enzyms) synthetisiert werden, in ihrem aktiven Zentrum ein Cystein tragen und in einem Substratprotein vor einem Aspartat spalten. Der Name Caspase leitet sich daher aus Cysteinylaspartase ab [87]. Die

Caspase-Kaskade wird durch die Initiator-Caspasen-2, -8/10 und -9 eingeleitet, in deren Ablauf die Initiator-Caspasen durch Proteolyse die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktivieren und dadurch die Exekution des Zelltods einleiten [86].

Die Entwicklung von gezielten Bcl-2/Bcl-x_L-Inhibitoren als Krebstherapeutika ist vielversprechend, da diese Proteine häufig in Tumoren hochreguliert sind [88].

1.4 AUSWAHL DER LEITSTRUKTUREN

1.4.1 CSN-Inhibitoren

Das humane COP9 Signalosom (CSN) ist ein konservierter Proteinkomplex, der am Schnittpunkt zwischen Signalübertragung und Ubiquitin (Ub)-abhängiger Proteolyse fungiert [89]. Durch Phosphorylierungen des Tumorsuppressors p53 und des Transkriptionsfaktors c-Jun (Kapitel 1.3.1.2) beeinflusst das CSN u.a. die p53-abhängige Apoptose in Kolonkarzinomzellen [90]. Neue Signalosom-Inhibitoren sollten daher die Phosphorylierungsaktivität des CSN hemmen. Die Kinaseaktivität wird durch die antiinflammatorischen und –karzinogenen Wirkstoffe Curcumin [91] und Emodin [39] gehemmt (Abb. 13).

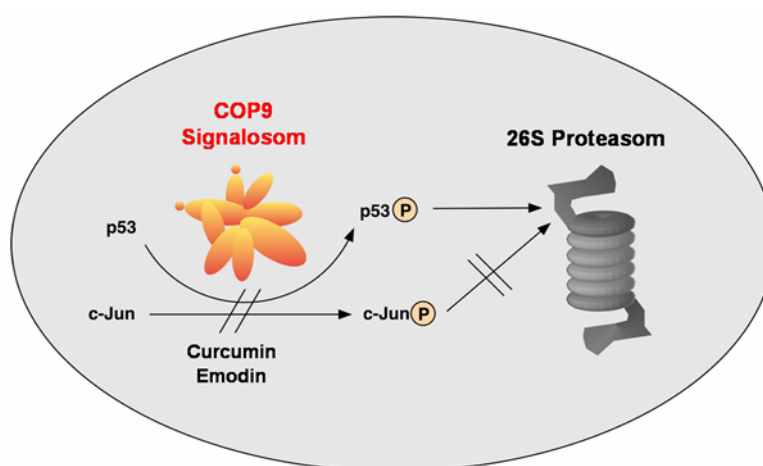


Abbildung 13: Modell der Wirkung von Curcumin und Emodin auf den proteolytischen Abbau von p53 und c-Jun.

Die Phosphorylierung von p53 und c-Jun wird durch Curcumin und Emodin gehemmt, was den Abbau von p53 durch das 26S Proteasom verhindert und den Abbau von c-Jun fördert. Durchgestrichener Pfeil: Hemmung (Abbildung von Prof. Wolfgang Dubiel zur Verfügung gestellt)

Diese bereits bekannten Inhibitoren wurden daher in der vorhandenen Arbeit als Leitstrukturen für das *in silico* Screening verwendet (Abb. 14).

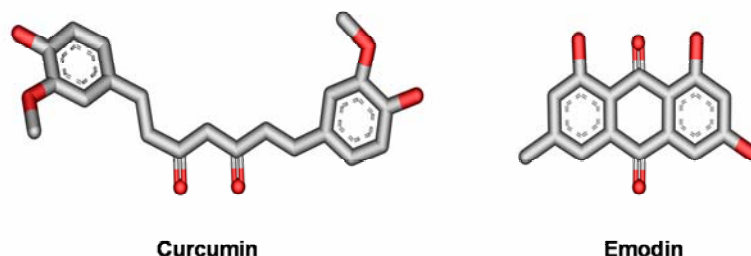


Abbildung 14: 3D-Darstellung der verwendeten Leitstrukturen Curcumin und Emodin.

1.4.2 Apoptoseinduktion durch den Naturstoff Betulinsäure

Der Naturstoff Betulinsäure (BA), der in der Rinde der Birke vorkommt, ist ein pentacyklisches Triterpen (Abb. 15). Dieser Kleinstruktur wird eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten zugeordnet. Neben der anti-viralen Wirkung bei der Replikation von HIV-1 [92], konnten ebenfalls anti-entzündliche [93] und anti-bakterielle [94] Aktivitäten nachgewiesen werden. Seit den 70er Jahren wird die BA als mögliches Anti-Krebsmittel [95] beschrieben, aber der Wirkmechanismus konnte noch nicht gelöst werden [96].

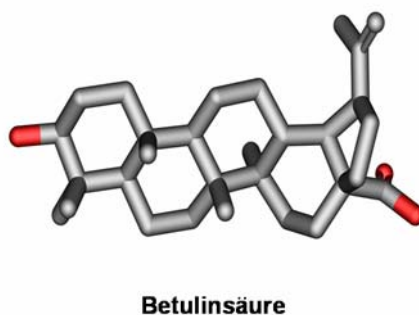


Abbildung 15: 3D-Struktur der Betulinsäure.

Die durch BA-induzierte Apoptose in sensitiven Zellen wurde als p53- und CD95-unabhängig und durch Bcl-2 hemmbar beschrieben [97]. Die Beeinflussung des mitochondrialen Signalweges durch die Betulinsäure soll mittels experimenteller Methoden in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Da die BA effektiv Apoptose in Krebszellen induziert wird sie in dieser Arbeit als Leitstruktur für ein *in silico* Screening verwendet.

1.4.3 Bcl-2-Inhibitoren und Photoschalter

1.4.3.1 Niedermolekulare Bcl-2-Antagonisten

Die Entwicklung von niedermolekularen Substanzen, die gezielt Bcl-2 und/oder Bcl-x_L inhibieren sollen, ist in den letzten Jahren mehr und mehr in den Fokus der Therapeutika-Entwicklung gerückt [88, 98, 99, 100, 101, 102]. Wang *et al.* haben durch Docking-Experimente den Bcl-2 Inhibitor HA 14-1 identifiziert, dessen Bindung an Bcl-2 durch einen Fluoreszenz-Polarisations-Assay (FPA) nachgewiesen wurde [100]. Die Kombination von NMR basierten Bindungsstudien und FPAs führte zum Auffinden des Naturstoffs Gossypol, der die Bindung der BH3-Domänen an Bcl-x_L unterbindet. Der Bcl-2 Inhibitor ABT-737 wurde von Oltersdorf *et al.* mittels der „SAR by NMR“-Methode entwickelt, bei der zwei vermeintlich schwache Inhibitoren, die an benachbarte Bindungsstellen binden, miteinander verbunden werden, wodurch ein selektiver Inhibitor entsteht [88]. Durch die direkte Testung von > 16 000 Substanzen in einem FPA wurden die in der Literatur beschriebenen Inhibitoren BH3I-1 und BH3I-2 [101] gefunden. Diese stehen in dieser Arbeit als Leitstrukturen für ein *in silico* Screening zur Verfügung (Abb. 16).

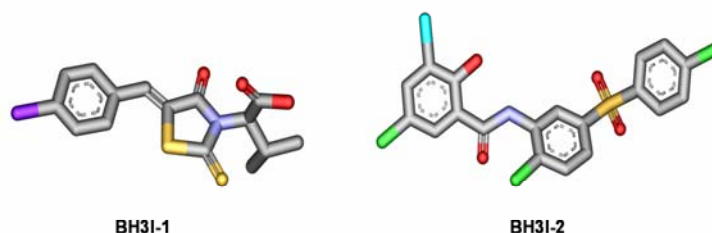


Abbildung 16: 3D-Strukturen der Bcl-2-Inhibitoren.

Die bereits bekannten Bcl-2-Inhibitoren BH3I-1 und BH3I-2 wurden als Leitstrukturen für ein *in silico* Screening verwendet.

1.4.3.2 Gezielte Apoptoseinduktion durch Photoschalter

Eine der schnellsten Reaktionen in der Natur ist die lichtinduzierte Isomerisierung eines Chromophors [103]. Rhodopsine, die an der Umwandlung von Licht in chemische Energie beteiligt sind, enthalten das Chromophor Retinal. Die Aktivierung des Rhodopsins wird durch die lichtinduzierte Isomerisierung des Retinals an einer spezifischen Doppelbindung ausgelöst [104]. Moleküle, die durch Bestrahlung ihre Konformation ändern können, finden bei vielfältigen Funktionen Anwendung, wie z.B. Ionentransport [105] und Proteinfaltung [106]. Die biologische Aktivität dieser Substanzen wird mittels Lichteinstrahlung bei bestimmter Wellenlänge verändert [107]. Die Klasse der Hemithioindigo-Moleküle (Abb. 17) wird, aufgrund der Stabilität ihrer durch Bestrahlung hervorgerufenen Konformation, besonders häufig verwendet. Nach durchgeführter Bestrahlung liegt der Anteil des jeweiligen Konformers (cis oder trans) bei > 80 %. Nach einer bestimmten Halbwertszeit, die u.a. von der Temperatur und dem Lösungsmittel abhängig ist, findet ein reversibler, spontaner Übergang der Konformere bis zum einem *photo-stationary state* (pss) statt [108, 109].

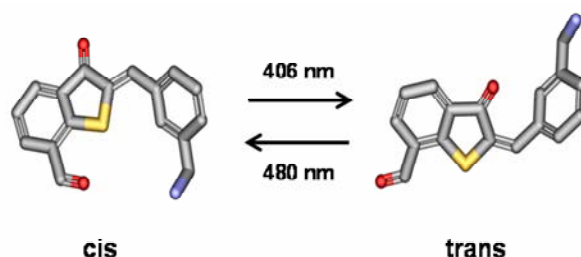


Abbildung 17: 3D-Darstellung des Photoschalters Hemithioindigo.

Die *cis*-Konformation des Hemithioindigo Photoschalters kann durch Bestrahlung mit einer definierten Wellenlänge (406 nm) in die *trans*-Konformation umgewandelt werden. Zur Umwandlung von *trans* nach *cis* ist eine Bestrahlung mit der Wellenlänge 480 nm notwendig.

Der Einbau dieses Moleküls soll an ein α -helikales Peptid (BH3-Helix) aus dem pro-apoptotischen Protein Bid erfolgen, wobei sich Peptidbindungen zwischen den Carboxyl- bzw. Aminogruppen des Photoschalters und der Aminosäuren des α -helikalen Peptides bilden. Durch die Konformationsänderung des Photoschalters nach erfolgter Bestrahlung wird auch das Peptid einer Konformationsänderung unterzogen und eine Destabilisierung sowie eine funktionelle Inaktivierung des pro-apoptotisch wirkenden Peptides herbeigeführt. Die Reversibilität dieses Prozesses macht diese Methode zu einem vielversprechenden Ansatz zur Entwicklung neuer Krebstherapeutika.

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Entwicklung effektiverer Wirkstoffe gegen Krebs ist von großer Bedeutung. Durch den Einsatz von neuen, computergestützten Methoden, können die Zeit und Kosten für die Identifizierung potentieller Medikamente verringert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten anhand verschiedener Modellprojekte durch *in silico* Screenings neue, apoptoseinduzierende Substanzen identifiziert werden. Mittels verschiedener Eigenschaftsfilter sollte eine Beurteilung der Ergebnisse durchgeführt werden und eine Verbesserung der Erfolgsquoten durch das Einführen eines neuen Bewertungskriteriums erzielt werden. Durch Docking-Experimente mit den gefundenen Treffern sollten Bindungsaffinitäten und Bindungsenergien berechnet werden.

Diese theoretisch erlangten Ergebnisse sollten experimentell in Zelllinienmodellen *in vitro* verifiziert werden. Eine weiterführende Untersuchung im Rahmen des Betulinsäure-Analoga Projektes sollte Aufschluss über den Wirkmechanismus und Zielstrukturen geben.

Die folgenden Modellprojekte wurden bearbeitet:

1. Entwicklung von Inhibitoren, die die Kinaseaktivität des Signalosoms hemmen und somit einen Anstieg des intrazellulären p53-Spiegels hervorrufen und den Abbau von c-Jun auslösen. Curcumin und Emodin dienten als Leitstrukturen.
2. Untersuchung des Wirkmechanismus von Betulinsäure und Identifizierung von Betulinsäure-Analoga.
3. Identifizierung von Bcl-2-Inhibitoren mittels der Leitstrukturen BH3I-1 und BH3I-2. Weiterhin sollte eine gezielte Apoptoseinduktion durch eine lichtinduzierte Aktivierung eines pro-apoptotischen Bax-aktivierenden Peptides aus dem BH3-only Protein Bid ausgelöst werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 *IN SILICO* SCREENING

Früher wurde bei der computergestützten Medikamentenentwicklung der Fokus auf die Substruktursuche in großen chemischen Datenbanken gelegt [110]. Diese wurde schließlich in den späten 80er Jahren durch die Ähnlichkeitssuche ergänzt [111, 112]. Es wurden nun nicht mehr nur Moleküle gesucht, die die angegebene Substruktur enthielten (2D), sondern auch die ähnlichsten Moleküle zu einer Referenzstruktur (Leitstruktur), indem strukturelle/räumliche Ähnlichkeiten (3D) berücksichtigt wurden [113, 114].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination aus 2D- und 3D-Suchen angewandt. Die Suchen wurden in der institutsinternen Datenbank durchgeführt, die mehr als vier Millionen Moleküle und mehr als 100 Millionen Konformere zu den Molekülen enthält (genaue Angaben zu Herstellern und Anzahl der Moleküle sind im Anhang angegeben (Tab. 21)). Weiterhin wurden Eigenschaftsfilter, die eine zusätzliche Bewertung der Moleküle zulassen, angewendet. Im Folgenden werden die angewendeten 2D- und 3D- Suchmethoden, sowie die Eigenschaftsfilter, näher erläutert.

3.1.1 2D-Suchen

Als Ausgangspunkt für die zweidimensionale (2D)-Suche dienen die Strukturformeln von kleinen Molekülen. Die topologische oder zweidimensionale Ähnlichkeit zwischen zwei Molekülen wird über einen molekularen Fingerprint und die Berechnung von einer Ähnlichkeitsmetrik bestimmt. Ein Fingerprint ist eine abstrakte Darstellung der strukturellen und chemischen Eigenschaften eines Moleküls. Die Grundstruktur eines molekularen Fingerprints, der sogenannte *structural key*, ist ein binärer Bit-String in dem die Eigenschaften des Moleküls gespeichert sind [115]. Jedes Bit in dem molekularen Fingerprint kodiert für eine bestimmte funktionelle Gruppe. Dieses Bit wird auf 1 gesetzt, wenn die funktionelle Gruppe in dem Molekül vorhanden ist, andernfalls bekommt es den Wert 0. In der Datenbank wurden die MACCS-Schlüssel der Firma MDL [116] verwendet, deren Bitlänge bei 960 Bits liegt. So genannte molekulare Hologramme geben die Anzahl und nicht nur die An- oder Abwesenheit der

funktionellen Gruppen an [117]. Bereits im Voraus berechnete Fingerprints für alle Moleküle in der Datenbank ermöglichen eine schnelle Ähnlichkeitssuche. Die hier verwendete Metrik ist der Tanimoto-Koeffizient (TK) (Abb. 18), der ein Maß für die Ähnlichkeit zwischen zwei Molekülen auf der Basis ihrer Fingerprints liefert. Die folgende Formel wird zur Berechnung des TK angewendet:

$$\text{TK} = \text{bitsAB} / (\text{bitsA} + \text{bitsB} - \text{bitsAB})$$

Abbildung 18: Berechnungsformel des Tanimoto-Koeffizienten (TK).

bitsAB: Bits, die im Fingerprint von Molekül A und Molekül B auf 1 gesetzt sind; bitsA: Bits, die nur im Molekül A auf 1 gesetzt sind; bitsB: Bits, die nur im Molekül B auf 1 gesetzt sind.

Der Wert des berechneten TK variiert zwischen 0 und 1, wobei der Wert bei gleichen Molekülen bei 1 und der Wert bei äußerst unterschiedlichen Molekülen bei 0 liegt. Moleküle, die einen Tanimoto-Koeffizienten von $\geq 0,85$ haben, wird eine ähnliche biologische Aktivität zugeschrieben [12].

3.1.2 3D-Suche

Als ein weiteres Kriterium zum Auffinden von biologisch aktiven Substanzen, wurde eine dreidimensionale (3D-) Suche, welche auf räumlicher Ähnlichkeit basiert, durchgeführt. Bei der Durchführung der Datenbanksuche wurden alle Moleküle der Datenbank räumlich mit der Leitstruktur überlagert. Um Moleküle, die eine räumliche Ähnlichkeit zur Leitstruktur besitzen, auszuwählen, wurden die am besten überlagerten Substanzen anhand eines berechneten 3D-Zählers extrahiert. Der Wert wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet [15]:

$$\text{3D-Zähler} = \% \text{ überlagerte Atome} * e^{-\text{rmsd}}$$

Einen Grenzwert für den 3D-Zähler, ab dem eine Substanz als positiver Treffer angesehen wird, kann nicht angegeben werden, da viele Faktoren, wie z.B. die Größe des Moleküls, berücksichtigt und für jedes Projekt neu beurteilt werden müssen. Für die Bewertung der Überlagerung werden für jedes Molekül energetisch günstige Konformere, die die Flexibilität der Moleküle repräsentieren und auf drehbare Bindungen

zurückzuführen sind, berechnet [118]. Überlagerungen aller Konformere von zwei Molekülen ergeben eine räumliche Ähnlichkeit, die durch das am besten überlagerte Paar von Konformeren dargestellt wird. Ein Algorithmus realisiert die Überlagerungen, indem die räumlichen Ausmaße der Moleküle auf folgende Weise berechnet werden:

Als Erstes wird die längste Ausdehnung eines Moleküls im Raum berechnet und eine Gerade mit minimalen quadratischen Abständen (rmsd) zu allen Atomen kalkuliert (Abb. 19 A). Anschließend wird eine Normale zur Ebene bestimmt, die ebenfalls einen minimalen quadratischen Abstand zu allen Atomen besitzt (Abb. 19 B). Im dritten Schritt wird die Senkrechte zu den anderen berechneten Geraden bestimmt. Der Schnittpunkt der drei geraden Linien beschreibt den Schwerpunkt des Moleküls (Abb. 19 C). Die Überlagerung von zwei Molekülen wird durch das Anpassen der vorberechneten Geraden in den vier möglichen Normalisierungen realisiert [15].

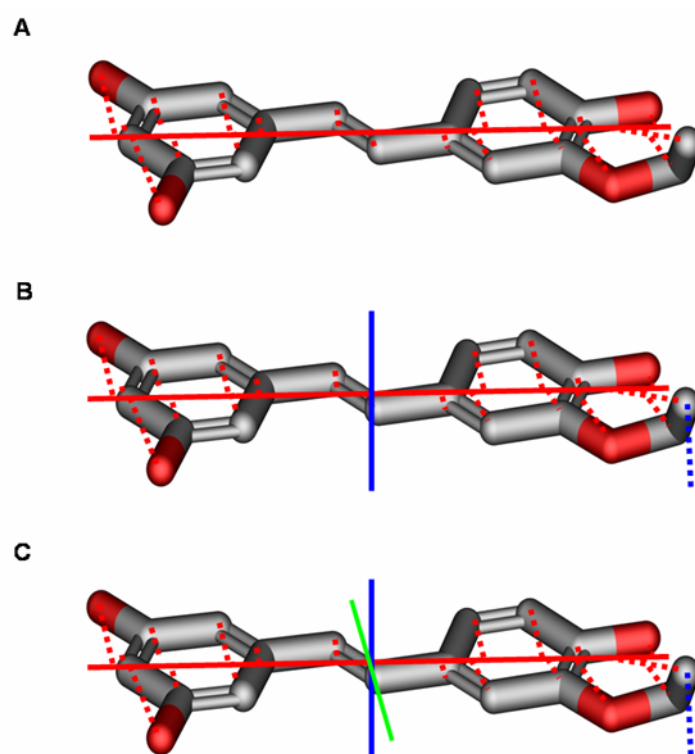


Abbildung 19: Darstellung der verschiedenen Schritte des 3D-Überlagerungsalgorithmus.

A Bestimmung einer Geraden, die die längste räumliche Ausdehnung darstellt und den minimalen quadratischen Abstand zu allen Atomen besitzt (rot). **B** Bestimmung der Normalen zur Ebene mit einem minimalen quadratischen Abstand zu allen Atomen (blau). **C** Bestimmung der Senkrechten zu den berechneten Geraden (grün).

3.1.3 Eigenschaftsfilter

Die Ergebnisse des erfolgten *in silico* Screenings werden anhand physikochemischer Eigenschaften gefiltert und ausgewertet. Während des Prozesses der Medikamentenentwicklung sind Eigenschaften wie Absorptionsvermögen und Verhalten im Stoffwechsel essentiell, um ein Molekül als Medikamenten-Kandidat zu charakterisieren. Beispielsweise kann gesagt werden, dass die Fähigkeit eines sehr polaren Moleküls zur Diffusion durch Membrane sehr schwach ist [119]. Als eine Richtlinie zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Kleinstrukturen, entwickelten Lipinski *et al.* [120] die so genannte 'Rule-of-Five', welche die Bewertung von vier physikochemischen Eigenschaften beinhaltet. Ein Molekül wird bezüglich seiner Fähigkeit zur Absorption oder Permeation als schwach eingestuft, wenn mehr als eine der folgenden Beschränkungen nicht eingehalten werden:

logP	≤ 5
Molekulargewicht	≤ 500 g/mol
Anzahl der Wasserstoff-Donoren	≤ 5
Anzahl der Wasserstoff-Akzeptoren	≤ 10

Studien haben gezeigt, dass die `Rule-of-Five` ein notwendiges, aber kein ausreichendes Kriterium zur Bewertung eines Moleküls ist [121]. Sie sollte daher als qualitativer und nicht quantitativer Eigenschaftsfilter verwendet werden [122].

Einer der informativsten physikochemischen Parameter ist hierbei der logP-Wert, der die Membrangängigkeit (Lipophilie) einer Substanz beschreibt. Als Modell für den Transport eines Wirkstoffs durch eine Membran, wurde von Hansch *et al.* die Verteilung der Verbindung zwischen 1-Octanol (ahmt die Lipidmembran nach) und Wasser vorgeschlagen [123, 124]. Den Verteilungskoeffizient P zwischen 1-Octanol und Wasser betrachtete er als geeignetes Maß für die Lipophilie eines Wirkstoffs. Die folgende Formel wurde zur Berechnung herangezogen:

$$\log P = \log \left(\frac{[Verbindung]_{Octanol}}{[Verbindung]_{Wasser} \times (1 - \alpha)} \right)$$

α : Dissoziationsgrad der Verbindung in Wasser.

Eine Verbindung mit negativem logP ist demnach in Wasser besser löslich als in 1-Octanol und sie verliert im Extremfall ihre Fähigkeit, Lipidmembranen zu durchqueren. Bei höherer Löslichkeit in der organischen Phase (1-Octanol) ist der logP positiv. Wird der logP eines Moleküls zu groß, verliert sie dementsprechend ihre Löslichkeit in Wasser.

Die Bestimmung der `Rule-of-Five` wurde mit Hilfe des Excel Zusatzmoduls „Accord for Excel“ von der Firma Accelrys durchgeführt [118].

3.1.4 Docking

Um die Bindungsaffinität der gefundenen Substanzen zu überprüfen, wurde das Docking-Programm *GOLD* verwendet, welches aus zwei Hauptteilen besteht:

- (1) Scoring Funktionen unter Berücksichtigung von z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Kräfte und Torsionsenergien.
- (2) Ein Algorithmus zur flexiblen Positionierung des Liganden in die Proteinbindungsstelle [125].

Zu (1)

GOLD bietet zwei verschiedene Scoring Funktionen an [125, 126]:

- a) Die *GOLDScore* Fitnessfunktion wurde für die Vorhersage von Ligand-Bindungs-Positionen optimiert und berücksichtigt Faktoren, die durch die Terme der folgenden Berechnungsformel geprägt sind [127]:

$$GOLDScore = S_{hb_ext} + S_{vdw_ext} + S_{vdw_int} + S_{tors} + S_{con}$$

S_{hb_ext} :	Zähler für die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Ligand.
S_{vdw_ext} :	Zähler für die van der Waals-Kräfte zwischen Protein und Ligand.
S_{vdw_int} :	Zähler für intramolekulare van der Waals-Kräfte innerhalb des Liganden.
S_{tors} :	Zähler für die Torsionsenergie innerhalb des Liganden.
S_{con} :	<i>constraint scoring contribution</i> , Beitrag für die Erfüllung von Bedingungen, die der Benutzer angibt und frei wählen kann.

- b) Die ChemScore-Fitnessfunktion schätzt die Änderung der freien Energie ab, die bei der Bindung des Liganden an das Protein entsteht [127]. Der Original ChemScore wird nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{hbond}} \times S_{\text{hbond}} + \Delta G_{\text{metal}} \times S_{\text{metal}} + \Delta G_{\text{lipo}} \times S_{\text{lipo}} + \Delta G_{\text{rot}} \times H_{\text{rot}}$$

ΔG_0 :	freie Standardenthalpie, hier -5.48 kJ/mol.
ΔG_{hbond} :	Regressionskoeffizient für Wasserstoffbrückenbindungen, hier -3.34 kJ/mol.
S_{hbond} :	Zähler für Wasserstoffbrückenbindungen, die durch das Docking zweier Reaktionspartner entstehen.
ΔG_{metal} :	Regressionskoeffizient für Akzeptor-Metall-Interaktionen, hier -3.34 kJ/mol.
S_{metal} :	Zähler für die Interaktion zwischen Metall-Atom und Akzeptor; ist rein abstandsabhängig.
ΔG_{lipo} :	Regressionskoeffizient für lipophile Wechselwirkungen, hier -0.117 kJ/mol.
S_{lipo} :	Dieser Zähler wird genauso wie S_{metal} berechnet, jedoch erlaubt dieser eine größere Reichweite zwischen zwei Atomen.
ΔG_{rot} :	Regressionskoeffizient für die Abnahme der konformellen Entropie des Liganden durch die Bindung an das Protein, hier 2.56 kJ/mol.
H_{rot} :	Zähler für die Abschätzung des Verlusts an Entropie, wenn einfache, azyklische Bindungen ihre freie Drehbarkeit durch intermolekulare Bindungen verlieren.

Für das Docking-Programm *GOLD* wurde die ChemScore-Funktion um drei Terme erweitert und baut sich demnach folgendermaßen auf:

$$\text{GOLD ChemScore} = \Delta G_{\text{binding}} + E_{\text{clash}} + E_{\text{int}} + E_{\text{con}}$$

E_{clash} :	Straf-Zähler; der Clash-Term wird über alle Nicht-Wasserstoff Atompaaire zwischen Protein und Ligand summiert, welche einen festen Abstand r_{clash} (meist 1.6 Å) unterschreiten (strukturelle Zusammenstöße).
E_{int} :	Straf-Zähler; intramolekulare Energie des Liganden, welche durch Torsionsspannung und interne Clashes entsteht. Die internen Clashes werden analog zum E_{clash} berechnet, jedoch nur auf die Liganden-Atome bezogen. Der Torsionsterm wird aus der Summe der Energie aller drehbaren Bindungen berechnet.
E_{con} :	<i>constraint scoring contribution</i> , Beitrag für die Erfüllung von Bedingungen, die der Benutzer angibt und frei wählen kann. Entspricht S_{con} der <i>GOLDScore</i> Fitnessfunktion.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Docking-Läufe wurden die *GOLD-Score* Fitnessfunktion und der Original ChemScore angewendet.

Zu (2)

GOLD positioniert den Liganden in die Proteinbindungsstelle über so genannte *fitting points*. Das Programm fügt diese *fitting points* und Wasserstoffbrücken ausbildende Gruppen in Ligand und Protein und bildet H-Brücken-Akzeptor-Punkte aus dem Liganden auf H-Brücken-Donor-Punkte aus dem Protein ab und umgekehrt. Zusätzlich generiert *GOLD* „hydrophobe *fitting points*“ in der Proteinbindungsstelle, auf die Kohlenwasserstoffgruppen des Liganden abgebildet werden.

Der in *GOLD* zu Grunde liegende Suchalgorithmus gehört zur Familie der genetischen Algorithmen, welche von der Populationsgenetik inspiriert wurden. Diese sind Optimierungsalgorithmen, die in einer großen Anzahl von möglichen Lösungen nach der Besten suchen, welche durch eine Fitnessfunktion bestimmt werden. Die Lösungen werden als “Chromosomen” codiert und untereinander rekombiniert. Daraus resultierende Lösungen werden dann entsprechend der Fitnessfunktion evaluiert, gefiltert und an die nächste Generation von Lösungen weitergegeben. Diese Rekombination läuft so lange ab, bis eine optimale Lösung gefunden wurde [128]. Der genetische Algorithmus in *GOLD* optimiert folgende Parameter: Dieder-Winkel drehbarer Bindungen und die Ring-Geometrie von Ring-Verbindungen in Liganden (somit ist die Konformation des Liganden flexibel), Torsionswinkel der Hydroxylgruppen von Serin, Threonin und Tyrosin sowie der Aminogruppe von Lysin in der Proteinbindungsstelle (partielle Flexibilität des Proteins) und die Abbildung der *fitting points* aufeinander (die Position des Liganden in der Proteinbindungsstelle). Zu Beginn des Dockings werden diese Parameter zufällig gewählt. *GOLD* erlaubt dem Benutzer weitere Parameter, wie z.B. die Populationsgröße (die Anzahl der zu verwendenden “Chromosome”), den Selektionsdruck oder die Anzahl der Rekombinationsereignisse frei zu wählen.

Folgende Parameter wurden für die vorliegende Arbeit verändert:

Die Anzahl der Konformere für jeden Liganden, die bei einem Docking-Lauf in die Proteinbindungsstelle gedockt werden sollen, wurde auf 50 gesetzt. Der genetische Algorithmus wird während eines Durchlaufs optimiert. Die Anzahl der Optimierungsschritte wurde auf 1 000 000 gesetzt.

3.1.5 Toxikologische Untersuchungen

Zur Untersuchung der toxikologischen Eigenschaften einer Substanz bietet die Firma Accelrys das Programm TOPKAT® an. Mit Hilfe verschiedener Modelle wird eine Substanz auf ihre Toxizität, Mutagenität und Karzinogenität untersucht. Unter der Annahme, dass ausgehend von der Molekularstruktur der Substanzen Abschätzungen verschiedener toxischer Effekte berechnet werden können, benutzt TOPKAT® sogenannte QSTR (Quantitative Structure Toxicity Relationship)-Modelle. Für diese Modelle wurden öffentlich zugängliche Daten bezüglich der Toxizität von Substanzen ausgewertet, die jeweils unter vergleichbaren Bedingungen gewonnen wurden [129]. Vier statistisch signifikante QSTR-Modelle und die entsprechenden Daten beinhaltet das NTP (National Toxicology Program) *Rodent Carcinogenicity* Modul aus TOPKAT®. Jedes QSTR-Modell bezieht sich auf eine Spezies/Geschlecht (männliche Ratte, weibliche Ratte, männliche Maus, weibliche Maus). Eine berechnete Wahrscheinlichkeit von unter 0,3 indiziert, dass diese Substanz nicht kanzerogen ist. Bei Werten zwischen 0,3 und 0,7 handelt es sich um einen statistisch unbestimmten Bereich. Sollte der Wert jedoch über 0,7 liegen, so wird ein krebserregendes Potential für diese Substanz, unter der Annahme des vorliegenden Modells (z.B. männliche Ratte), angenommen. Die orale, akute mittlere Dosis bei Ratten wird in TOPKAT® mittels des Rat Oral LD50 Moduls abgeschätzt. Die Daten wurden von LD50-Werten von über 4 000 Chemikalien zusammengefasst. Gleichzeitig wird berechnet, ob die übermittelte Struktur zum *Optimum Prediction Space* (OPS) des Modells gehört. Ist dies nicht der Fall, kann keine Aussage über die Toxizität der Substanz getroffen werden.

3.1.6 NCI-Wirkprofile als neues Bewertungskriterium beim *in silico* Screening

Die GI₅₀-Werte von mehr als 40 000 Substanzen, die vom *National Cancer Institute* (NCI) im Rahmen einer Testreihe in 60 verschiedenen humanen Tumorzelllinien erhoben wurden, sind in einer Datenbank gespeichert worden. In dieser Datenbank können Suchen bezüglich struktureller Ähnlichkeit und einem ähnlichen Wirkprofil durchgeführt werden. Die Berechnung der strukturellen Ähnlichkeit von zwei Molekü-

len basiert auf dem Tanimoto-Koeffizienten. Bei einem Tanimoto-Koeffizienten von $\geq 0,85$ kann auch auf eine ähnliche biologische Aktivität geschlossen werden.

3.2 MATERIALIEN

3.2.1 Primäre Antikörper für die Westernblot-Analyse

Zielprotein	Art	Organismus	Verdünnung	Bezugsquelle
Aktin	Polyklonal	Kaninchen	1:500	Sigma, München
Caspase-3	Polyklonal	Ziege	1:1000	R&D Systems, Wiesbaden
Caspase-8	Monoklonal	Maus	1:1000	Cell Signaling Technology Beverly, MA, USA
Caspase-9	Polyklonal	Ziege	1:1000	R&D Systems, Wiesbaden
Cytochrom c	Klon 7H8.2C12	Maus	1:500	PharMingen, Heidelberg

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antikörper.

3.2.2 Sekundäre Antikörper für die Westernblot-Analyse

HRP-konjugiert anti-Maus IgG: Promega, Mannheim

HRP-konjugiert anti-Kaninchen IgG: Promega Mannheim

HRP-konjugiert anti-Ziege IgG: Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg

3.2.3 Verwendete Kleinstrukturen

Kleinstruktur	Hersteller
BTB00363, SEW04213, BTB14431, JFD02836, JFD03665, SEW04213	Maybridge, Tintagel, England
PHAR040741	Pharmeks, Moskau, Russland
NP-009909, NP-010362, BN 10953, NP-009993, B-0442-B-10, B-1000-B-09, 1N-11095, 1N-27708, 1N-19281, 1N-00217, 1N-17882, 1N-19066, 1N-21388, 1N-23299	Analyticon, Potsdam, Deutschland
1S-55234, 3S-91283, 3S-12317	InterBioScreen, Moskau, Russland
A0746-0034828, A2862-0120683	Ambinter, Paris, Frankreich
BAS 1279930, BAS 0536121, BAS 0289097, BH3I-2	Asinex, Moskau, Russland
Curcumin, Piceatannol, Ursolsäure, Betulinsäure, BH3I-1, Gossypol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Emodin, Resveratrol	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete niedermolekulare Substanzen und die dazugehörigen Hersteller.

3.2.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	HERAcell (Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland) Heraeus Brutschrank (Jetzt: Kendro Laboratory Products)
Elektronischer Cell Counter	Casy [®] Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland)
Durchflußzytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Feinwaagen	BP221S und BP610 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Fluoreszenz-Mikrotiterplattenscanner	FluoStar Reader + Easy-Software Version 7.01 (Tecan, Crailsheim, Deutschland),

	Fluoroscanner II (Labsystems OY, Helsinki, Finnland)
Gefrierschränke	- 20°C Comfort (Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland) - 80°C (Liebherr und New Brunswick Scientific, Ultra Low Freezer U41085, Nürtingen, Deutschland)
Geltrockner	Phero-temp 40 (Biotec-Fischer, Reiskirchen, Deutschland)
Heizblock	Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Kühlzentrifugen	Biofuge 15R (Kendro Laboratory Products) Modell J2-21 (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland)
Magnetrührer	MR 3001K (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland)
Photometer	Ultrospec 1000 (Amersham Biosciences, München, Deutschland)
Pipetten	5 ml, 1 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 2 µl (Gilson International, Middleton, USA)
SDS-PAGE System	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Schüttler	Unimax 2010 (Heidolph Instruments)
Spannungsquelle	Power-Supply, Power Pac 300 (BioRad Laboratories)
Tischzentrifugen	Biofuge fresco (Kendro Laboratory Products) Megafuge 1.0 R (Kendro Laboratory Products)
Vortexer	Reax control (Heidolph Instruments)
Westernblot-System	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad Laboratories)

Tabelle 3: Verwendete Geräte und die dazugehörigen Hersteller.

3.2.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Acrylküvette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland
Nitrozellulosemembran BA 85, 0,2 µm	Schleicher&Schüll, Dassel, Deutschland
Plastikpipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1 ml, 5 ml (Sarstedt)
Quarzküvetten Suprasil	Hellma, Müllheim, Deutschland
Reaktionsgefäße	0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml Eppendorf
Röntgenfilme	X-Omat UV Film und Biomax MR (Kodak, Stuttgart, Deutschland)
Whatman Filterpapier (2 mm)	Schleicher&Schüll
Zellkulturflaschen	25 cm ² (50 ml), 75 cm ² (250 ml), 182 cm ² (650 ml) Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturplatten	6-well, 96-well Greiner Bio-One GmbH

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien und die dazugehörigen Hersteller.

3.2.6 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel von der Karl Roth GmbH & Co aus Karlsruhe oder von der AppliChem GmbH aus Darmstadt bezogen. In der Regel wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades verwendet.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	BioRad Laboratories
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma
Annexin-V-FITC	PharMingen
Caspase-Inhibitor VI (z-VAD-fmk)	Calbiochem, Bad Soden. Deutschland
Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tabletten)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Digitonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
DNase freie RNase A	Roche Diagnostics
FCS („Fetal calf serum“)	GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland
[γ - ^{32}P]-ATP	Amersham Biosciences
JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-,Benzimidazolyl-Carbocyaninjodid)	Molecular Probes, Leiden Niederlande
PBS Puffer (10x) (pH 7,2)	GIBCO Life Technologies GmbH
Penicillin/Streptomycin	GIBCO Life Technologies GmbH
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma
Ponceau-Rot	Sigma
Propidiumjodid	Sigma
RPN 800V („Full Range Rainbow recombinant Protein molecular marker“)	Amersham Biosciences
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Triton X-100	Sigma
Trypsin-EDTA (1x)	GIBCO Life Technologies GmbH

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und die dazugehörigen Hersteller.

3.2.7 Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
10 x AB-Puffer	300 mM Tris, 100 mM KCl, 5 mM DTT pH 5,8
Annexin-Bindungspuffer	10 mM <i>N</i> -[2-hydroxyethyl]piperazin- <i>N'</i> - 3 [propansulfonicacid]/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl ₂
Blockpuffer	5 % [w/v] Magermilchpulver in PBS
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Methanol pH 8,3
Coomassie-Färbelösung	2 % [w/v] Coomassie Brilliant Blau R- 250, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure
Entfärberlösung	30 % Methanol, 10 % Essigsäure
Hypertonischer Puffer	20 mM Hepes pH 7,4, 10 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA
Lysepuffer I	0,303 g Tris pH 7,5, 4,6 g Saccharose, 0,5 ml Triton X-100, 1 x Protease Inhibi- tor Cocktail Tablette, ad 50 ml
Lysepuffer II	50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA ergänzt mit 2 mM ATP, 5 mM MgCl ₂ , 10 µg/ml Aproti- nin, 1 mM PMSF
PBS	8 g NaCl, 1,35 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ , in 800 ml aqua dest. lösen, auf pH 7,4 einstellen mit HCl, ad 1 l
PBST	PBS + 0,1 % Tween
Ponceau-Färbelösung	0,2 % Ponceau-Rot in 5 % Trichloressig- säure
Resuspensionspuffer	Hypertonischer Puffer und zusätzlich 7 µl Digitonin/ml Puffer, 10 µl PMSF/ml Puffer
Sammelgelpuffer	0.5 M Tris HCl pH 6.8
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS in dH ₂ O
Trenngelpuffer	1.5 M Tris HCl pH 8.8

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Aqua dest. angesetzt.

3.2.8 Nährmedien

Nährmedium	Hersteller
RPMI Medium	GIBCO Life Technologies GmbH
DMEM / high Glucose (4.5 g/l) Medium	
McCoy's 5 A Medium	

Tabelle 7: Verwendete Nährmedien und der dazugehörige Hersteller.

3.2.9 Kits

Kit	Hersteller
„Bicinchoninic Assay Kit“	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
„Enhanced Chemiluminescence“ (ECL western blotting detection reagent)	Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland
Cell Growth Determination Kit (MTT)	Sigma
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega, Mannheim, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Kits und die dazugehörigen Hersteller.

3.3 ZELLINIEN

Zelllinie	Beschreibung
B8	murine Fibroblasten Zelllinie aus BALB/c C4 Zellen, stabil transfiziert mit MCMV IE-1 Gen, Expression von pp89 [130]
BJAB mock	Burkitt-like Lymphom Zelllinie [131]; transfiziert mit einem leeren Expressionvektor
BJAB Bcl-x _L	Burkitt-like Lymphom Zelllinie [131]; transfiziert mit einem, die cDNA von Bcl-x _L enthaltenden, Expressionsvektor
DU145 mock	humane Prostatakarzinomzelllinie [132]; infiziert mit dem leeren retroviralen Vektor HyTK; dient als isogene Positiv-

	kontrolle
DU145 Bak	humane Prostatakarzinomzelllinie [132]; Bak wird durch Transfektion mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3, der die Bak cDNA enthält, stabil überexprimiert
DU145 Bax	humane Prostatakarzinomzelllinie [132]; durch Transduktion mit dem retroviralen Vektor HyTK, der humane Bax- α cDNA enthält, wird stabil Bax reexprimiert
HCT116 wt	humane Kolonkarzinomzelllinie [133], freundlicherweise von Dr. Bert Vogelstein (Johns Hopkins Cancer Center, Baltimore, MD, USA) zur Verfügung gestellt
HCT116 Bak k.d.	humane Kolonkarzinomzelllinie [133]; stabil transfiziert mit shRNA gegen Bak
HCT116 Bax k.o.	humane Kolonkarzinomzelllinie [133]; isogene Bax <i>knock-out</i> Zelllinie
HCT Bax k.o. Bak k.d.	humane Kolonkarzinomzelllinie [133]; isogene Zelllinie mit Bax k.o. und Bak k.d.
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie [134]
Jurkat A3	humane T-Zell Leukämiezelllinie [135]; freundlicherweise von Dr. J. Blenis (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt
Jurkat mock / pRC-CMV	humane T-Zell Leukämiezelllinie [135]; transfiziert mit dem leeren retroviralen Vektor pRC-CMV; dienen als isogene Kontrolle
Jurkat Bcl-2	humane T-Zell Leukämiezelllinie [135]; Überexpression von Bcl-2 durch Transduktion mit dem retroviralen Vektor pRC-CMV, welcher humane Bcl-2 cDNA unter der Kontrolle des CMV Promotors enthält
Jurkat Bcl-x _L	humane T-Zell Leukämiezelllinie [135]; retrovirale Infektion mit dem Vektor pRC-CMV, welcher humane Bcl-x _L cDNA unter der Kontrolle des CMV Promotors enthält
MEF WT	murine embryonale Fibroblasten
MEF Bax -/-	murine embryonale Fibroblasten; isogene Bax <i>knockout</i> Zelllinie
MEF Bak -/-	murine embryonale Fibroblasten; isogene Bak <i>knockout</i> Zelllinie
MEF DKO	murine embryonale Fibroblasten; isogene Bax/Bak <i>knockout</i> Zelllinie

Tabelle 9: Beschreibung der verwendeten Zelllinien.

3.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die BCA (Bicinchoninsäure)-Methode [136] zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit aus. Sie beruht auf einer Komplexbildung zwischen Cu^{2+} -Ionen und Proteinen im alkalischen Milieu, die eine Reduktion der Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen gestattet. Die Reduktion erfolgt durch die Seitenketten von Cystein, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung. Das Natriumsalz der Bicinchoninsäure bildet einen Komplex mit den Cu^+ -Ionen, wodurch ein rotes Chromophor mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm entsteht. Die Messungen werden in einer 96-well Platte in einem ELISA-Reader durchgeführt. Als Berechnungsgrundlage dient ein BSA Proteinstandard im Bereich von 0,2 – 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(variiert nach Laemmli [137])

Bei der SDS-PAGE wurden Proteine mit dem Biorad-System, gemäß ihrem Molekulargewicht, unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Gelen (Endkonzentration 8 % bis 16 % Polyacrylamid) aufgetrennt. Folgende Lösungen wurden für zwei 0,75 mm Gele angesetzt:

Trenngel (x %, 10 ml): 2,5 ml Trenngelpuffer, x ml 30 % Polyacrylamid, 100 μl SDS (10 %), 50 μl APS (10 %), 5 μl TEMED, ad. H_2O

Sammelgel (5 %, 3 ml): 750 μl Sammelgelpuffer, 500 μl 30 % Polyacrylamid, 30 μl SDS (10 %), 15 μl APS (10 %), 3 μl TEMED, ad. H_2O

Proteinlösungen wurden zunächst mit SDS-Laufpuffer (Endkonzentration 1 x) versetzt, zur Denaturierung 5 min aufgekocht und anschließend auf das Gel geladen. Als Standard wurde ein Proteingrößenmarker verwendet. Bei einer Spannung von 160 V erfolgte die Trennung.

3.4.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 20 – 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde die überschüssige Farbe aus dem Gel, durch mehrmaliges Waschen mit Entfärberlösung, entfernt. Die Gele wurden auf Filterpapier bei 80°C für 90 min getrocknet.

3.4.4 Westernblot

Im elektrischen Feld wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Zwischen je zwei Lagen Filterpapier wurden das Gel und die Membran in das Westernblot-System eingespannt. Bei einer konstanten Stromstärke von 120 mA und einer Dauer von 1 h wurde der Westernblot bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt (siehe Kapitel 3.3.1.3) und anschließend 1 h mit Blockpuffer bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (in 5 % PBST) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Membran mit Sekundärantikörper (Peroxidase-gekoppelt) für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssige Antikörperlösung wurde erneut durch Waschen mit PBST (3 x 10 min) entfernt. Die Detektion erfolgte mittels der ECL-Technik nach Herstellerangaben mit X-Omat UV-Filmen.

3.4.5 Ponceau S-Färbung von Nitrozellulosemembranen

Die Proteine (> 100 ng) auf der Nitrozellulosemembranen wurden mit Ponceau-Färbelösung für 3 min rot angefärbt, auf gleichmäßige Beladung und Proteintransfer kontrolliert und anschließend der Hintergrund durch mehrmaliges Spülen mit H₂O entfärbt.

3.4.6 Kinaseassay (*in vitro*)

Für die *in vitro* Phosphorylierung wurde Full-length c-Jun (1 µg) mit rekombinanter CK2 (2α2β) (25U), rekombinanter PKD (7 ng/µl) oder aus humanen Erythrocyten aufgereinigtem CSN (1 µg) in 1 x AB-Puffer und 0,2 µCi [γ -³²P]-ATP für 1 h bei 37 °C in einem Endvolumen von 20 µl inkubiert. Zusätzlich wurden zu den Ansätzen die Proteinkinaseinhibitoren Emodin, Resveratrol, Curcumin oder Piceatannol, sowie die durch das *in silico* Screening gefundenen potentiellen neuen Inhibitoren BTB00363, SEW04213, BTB14431, JFD02836 oder JFD03665 in verschiedenen Konzentrationen (0, 20, 50, 100 und 200 µM) zugegeben. Durch die Zugabe von 3 µl 4 x SDS-Ladepuffer wird die Reaktion gestoppt und die Proben anschließend für 3 min aufgeköcht. Nach Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE (Kapitel 3.4.1) wurde das Gel mit Coomassie (Kapitel 3.4.5) gefärbt, entfärbt und getrocknet. Die Phosphorylierungen wurden mittels Autoradiographie der Gele, unter Verwendung von Biomax MR-Filmen, detektiert.

3.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.5.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden im jeweiligen Medium in Brutschränken bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre kultiviert. Kulturflaschen mit Gas-permeablen Verschlüssen gewährleisteten den Gasaustausch. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen umgesetzt, um eine Konfluenz zu vermeiden. Die Suspensionszellen wurden in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Bei den adhärenenten Zellen mussten diese nach kurzem Waschen mit PBS, durch dreiminütige Inkubation bei 37°C mit 0,1 %iger Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von serumhaltigem Zellkulturmedium gestoppt. Für die Versuche wurden jeweils nur Zellen verwendet, die sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden.

3.5.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität erfolgte entweder automatisch mittels eines Casy 1 Zellzählgeräts oder durch ein Neubauer-Hämozytometer. Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau versetzt. Während intakte vitale Zellen keinen Farbstoff aufnehmen können, erscheinen Zellen mit permeabler Membran blau.

3.5.3 MTT-Test

Zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität als indirektes Maß der Zellvermehrung wurde nach Zugabe der potentiellen Kinaseinhibitoren ein MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)-Test durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Fähigkeit einer in lebenden Zellen vorkommenden mitochondrialen Dehydrogenase, die Tetrazolium-Ringe des schwach gelben MTT zu oxidieren und dadurch dunkelblaue Formazan-Kristalle zu bilden, welche undurchlässig für die Zellmembran sind und somit in gesunden Zellen akkumulieren. Die Anzahl der lebenden Zellen ist, im Messbereich des Plattenphotometers, direkt proportional zur gemessenen Extinktion, d.h. der Konzentration des entstandenen Formazans.

HeLa-Zellen wurden mit den in verschiedenen Konzentrationen (20 oder 50 μM) zugegebenen Inhibitoren (Resveratrol, Emodin, Curcumin, Piceatannol, BTB00363, BTB14431, JFD02836, JFD03665 oder SEW04213) für 24 h inkubiert. Anschließend wurde eine in PBS gelöste MTT-Lösung mit einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu den Zellen gegeben. Nach vierstündiger Inkubation wurde das dunkelblaue Formazan mit 100 μl DMSO gelöst und die Absorption bei 590 nm im ELISA-Reader gemessen.

3.5.4 Durchflußzytometrie

Das Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg) ermöglicht die simultane Messung von verschiedenen Parametern, wie der relativen Größe, der Granularität, sowie drei verschiedener Fluoreszenzintensitäten (FL-1 = 537 nm; FL-2 = 597 nm; FL-3 = 650 nm) einzelner Zellen, die mit spezifischen fluoreszierenden

Reagenzien angefärbt wurden. Dazu werden suspendierte Einzelzellen in einem Hüllstrom in einer Quarzküvette an einem fokussierten Lichtstrahl und an einem luftgekühlten Argon-Laser (488 nm, 15 mW) vorbeigeleitet. Der einfallende Lichtstrahl interagiert mit der Zelle und wird dabei gestreut. Der im Strahlengang gestreute Teil (FSC; „forward scatter“) ist ein Maß für die Zellgröße. Der im rechten Winkel gestreute Lichtanteil (SSC; „side scatter“) stellt ein proportionales Maß für die Granularität dar. Für die Darstellung der Meßwerte wurden Histogramme gewählt, die die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Fluoreszenzverteilung zeigen. Dabei ist auf der x-Achse die jeweilige Lichtintensität und auf der y-Achse die dazugehörige Zellzahl dargestellt.

3.5.5 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$)

Zwischen innerer und äußerer Membran der Mitochondrien ist, in Folge der Zellatmung, ein elektrochemischer Gradient vorhanden, welcher durch die aktive, asymmetrische Verteilung von Protonen zwischen Intermembranraum und Matrix entsteht. Im Wesentlichen ist das Membranpotential dem Protonengradienten gleichzusetzen. Dieses Potential bildet die Grundlage der Methode, bei der kationische, lipophile Farbstoffe, wie z.B. JC-1, in der Matrix akkumulieren können. Diese JC-1 Monomere können Aggregate bilden, die eine Verschiebung in ihren Absorptions- und Fluoreszenzspektren bewirken.

Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz durch J-Aggregatbildung und der Höhe des Membranpotentials. In relativ frühen Stadien der Apoptose kommt es zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials, was sich nach JC-1 Färbung in einer Abnahme der im FL-2-Kanal des FACS-Gerätes gemessenen Fluoreszenzintensität bemerkbar macht.

Für die Messung wurden 1×10^5 Zellen mit Zytostatika in den angegebenen Konzentrationen für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und mit 2,5 µg/ml JC-1 in 1 ml PBS versetzt. Nach Inkubation bei 37°C für 30 min wurde mit PBS gewaschen, die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und sofort im Anschluß gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der CELLQuestPro Software.

3.5.6 Modifizierte Zellzyklusanalyse

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid, der sich interkalierend in die DNA-Doppelhelix einlagert, ist es möglich, eine quantitative Analyse der verschiedenen Phasen des Zellzyklus durchzuführen. Im Histogramm zeigen sich zwei charakteristische Gipfel, die die Zellen der G₀/G₁-Phase und die Zellen in der G₂/M-Phase darstellen. Die Fluoreszenz der Zellen in der G₂-Phase ist doppelt so hoch wie in der G₀/G₁-Phase, da in der G₂-Phase, im Gegensatz zu den 1-Chromatid-Chromosomen in der G₀/G₁-Phase, 2-Chromatid-Chromosomen vorliegen, also ein tetraploider DNA-Gehalt. Apoptotische Zellen weisen einen geringeren, hypodiploiden DNA-Gehalt auf und werden im Histogramm durch eine Population, die dem G₁-Gipfel vorgelagert ist, repräsentiert.

Nach der Behandlung mit den Zytostatika wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, mit 200 µl 2 % Formaldehyd in PBS in eine Mikrotiterplatte überführt und für 30 min auf Eis fixiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 300 x g wurde der Überstand entfernt, die Zellpellets in 50 µl eiskaltem PBS und 100 µl eiskaltem Ethanol resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, 50 µl RNase A (40 µg/ml in PBS) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellpellets in 200 µl Propidiumjodid-Lösung (50 µg/ml) resuspendiert und am FACS-Gerät im FL-3-Kanal gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der CELLQuestPro Software.

3.5.7 Cytochrom c Freisetzung

Zur Bestimmung der Cytochrom c Freisetzung wurden 2×10^6 Zellen mit der in verschiedenen Konzentrationen zugegebenen Betulinsäure für 48 oder 60 h inkubiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit PBS und hypertonem Puffer gewaschen. Die Resuspendierung der Pellets erfolgte mit hypertonem Puffer, welchem 7 µl Digitonin (0,75 mg/ml) und 10 µl PMSF (0,1 mM) zugesetzt wurden. Nach erfolgter Permeabilisierung der Zellen und Zentrifugation bei 350 x g für 15 min in einer Kühlzentrifuge wurde aus dem Überstand die zytosolische Proteinfraction abgenommen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer I resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch er-

neute Zentrifugation konnte die mitochondriale Proteinfraction aus dem Überstand gewonnen werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte sowohl für die zytosolische, als auch für die mitochondriale Fraktion in einer SDS-PAGE (Kapitel 3.4.2). Durch einen Westernblot (Kapitel 3.4.4) wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran überführt, mit Ponceau angefärbt und anschließend mit den gewünschten Primär- und Sekundärantikörpern behandelt. Die Detektion erfolgte mittels der ECL-Technik nach Herstellerangaben mit X-Omat UV-Filmen.

3.5.8 Annexin-V-FITC / PI Doppelfärbung

Zwischen innerer und äußerer Zellmembran sind Phospholipide asymmetrisch verteilt. Phosphatidylcholin und Sphingomyelin befinden sich an der Außenseite, wohingegen Phosphatidylserin nur an der Innenseite vorkommt. Während der frühen Phase der Apoptose wird Phosphatidylserin an die Außenseite transloziert und kann durch das Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-konjugierte Bindungsprotein Annexin V, welches spezifisch an Phosphatidylserin bindet, detektiert werden [138]. Durch die Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid können früh-apoptotische (Annexin-V-FITC positiv, Propidiumjodid negativ) und spät-apoptotische/nekrotische Zellen, die für beide Farbstoffe positiv sind, voneinander unterschieden werden. Zur Messung wurden die Zellen mit Zytostatika in den angegebenen Konzentrationen für 24 h inkubiert, anschließend geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Die Resuspendierung erfolgte in Annexin-Bindungspuffer. Nach Zugabe von 2 µl Annexin-V-FITC und 10 µl PI (50 µg/ml) wurden die Proben für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Es folgte sofort die simultane Messung Annexin-V-FITC positiver Zellen im FL-1-Kanal und die der PI-positiven Zellen im FL-2-Kanal des FACS-Gerätes. Die Auswertung erfolgte mit der CELLQuestPro Software.

3.5.9 Bestimmung der Anzahl Caspase-Aktivierung aufweisender Zellen

Die Gesamtaktivität von Caspasen in der Zelle läßt sich indirekt durchflußzytometrisch durch die Bindung fluoreszierender Caspase-Substrate auf Einzelzellniveau bestimmen. Verwendet wird dazu das zellpermeable FITC-konjugierte Peptid z-VAD-fmk. Die Peptidsequenz VAD entspricht einer Struktur, die von den aktiven Zentren aller zellulären Caspasen erkannt und gebunden wird. Die Bindung von VAD-fmk an aktivierte Caspasen führt zu einer Zunahme der Fluoreszenz der Zellen im Vergleich zur Kontrolle und kann dann im FL-1-Kanal des Durchflußzytometers gemessen werden.

Für die Messung wurden die Zellen für 48 h mit Zytostatika bzw., in den ausgewiesenen Ansätzen, zusätzlich mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk [40 µM] in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und das Pellet mit 100 µl PBS und 0,2 µl VAD-FITC resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS resuspendiert. Die Messung erfolgte sofort im FL-1-Kanal des FACS-Gerätes. Die Auswertung erfolgte mit der CELLQuestPro Software.

Als eine weitere Methode der Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurden B8-Zellen (10^4 /well) für 4 h mit den angegebenen Zytostatika inkubiert. Nach der Inkubation wurde das fluorochrome Caspase-3/7-Reagenz, das ein DEVD-Peptid enthält, zugegeben. Die Fluoreszenz wurde bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen.

3.5.10 Bestimmung des intrazellulären c-Jun- und p53-Gehaltes

Zur Überprüfung des intrazellulären Gehaltes von c-Jun nach Zugabe der inhibitorischen Substanzen wurden $5 - 7 \times 10^6$ HeLa-Zellen mit Curcumin, Resveratrol, Piceatannol, BTB00363, Emodin, SEW04231, BTB14431, JFD02836, oder JFD03665 in 0,25 % DMSO für 4 h in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach der Behandlung mit den Inhibitoren wurden die Zellen gesammelt und mit Lysepuffer II lytiert. Die Proteine der HeLa-Zelllysate wurden in der SDS-PAGE (Kapitel 3.4.2) ge-

trennt, mittels Westernblot (Kapitel 3.4.4) auf eine Nitrozellulosemembran überführt und der Gehalt an c-Jun mit einem Anti-c-Jun Antikörper überprüft.

Zur Bestimmung des Gehaltes an p53 wurden 5×10^6 B8-Zellen mit Resveratrol, Piceatannol, Emodin, BTB14431 und JDF02836 für 4 h in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Zelllysate wurden analog zu den HeLa-Zellen gewonnen und analysiert. Der Gehalt an intrazellulärem p53 wurde mit einem anti-p53 Antikörper durch eine Westernblot Analyse bestimmt.

3.5.11 Aktivierung/Inaktivierung der BH3 Helix durch Bestrahlung

Eine BH3–Helix aus dem BH3-only Protein Bid wurde mit einem Photoschalter synthetisiert (Synthese durch Dr. P. Henklein), der die Helix selektiv aktivieren bzw. inaktivieren kann. Nachdem die BH3 Helix in Medium (RPMI) gelöst wurde, wurde die Lösung mit Licht der Wellenlänge 406 nm (cis → trans) für 1 h oder mit Licht der Wellenlänge 480 nm (trans → cis) für 2 h bestrahlt, wodurch der Photoschalter in die gewünschte Konformation überführt wird. Anschließend wurde die aktivierte oder inaktivierte Helix in der gewünschten Konzentration zu den Zellen gegeben. Die Experimente wurden, so weit das möglich war, im Dunkeln durchgeführt. Damit der Photoschalter in der gewünschten Konformation verbleibt, wurde die Bestrahlung alle 12 h wiederholt.

4 ERGEBNISSE

In silico Screening spielt im Bereich der Medikamentenentwicklung eine wichtige Rolle [139], da durch die Vorauswahl der zu testenden Moleküle die aufzuwendende Zeit und die Kosten in der experimentellen Phase reduziert werden können. Diese Methode wurde in dieser Arbeit angewandt, um neue apoptoseinduzierende Substanzen zu identifizieren. Weiterführende *in vitro* Screenings dienten zur Verifizierung der Daten.

4.1 SIGNALOSOM INHIBITOREN

4.1.1 *In silico* Screening mit Curcumin und Emodin als Leitstruktur

Im ersten Modellprojekt der Arbeit wurden die Naturstoffe Curcumin und Emodin als Leitstrukturen für ein *in silico* Screening verwandt. Die Grundgerüste von Curcumin und Emodin sind sehr unterschiedlich. Curcumin gehört zur Gruppe der Polyphenole und ist aufgrund der Kohlenstoffkette, die auch ein 1,3-Diketon enthält, äußerst flexibel (Abb. 20 A). Im Gegensatz dazu hat Emodin ein Anthrachinon-Grundgerüst, das durch ein aromatisches 3er Ringsystem sehr starr ist (Abb. 20 B).

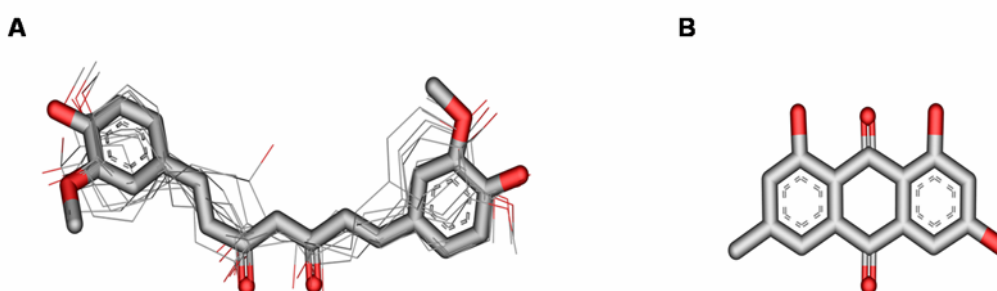


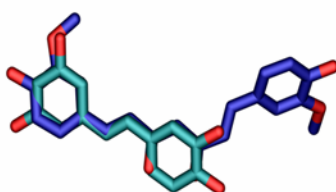
Abbildung 20: 3D-Struktur von A Curcumin und B Emodin.

Bei Curcumin sind die dazugehörigen Konformere (berechnet mit Catalyst® von der Firma Accelrys [118]) angegeben. Für Emodin können keine Konformere berechnet werden, da das Grundgerüst zu starr ist. Rot: Sauerstoff-Atome.

Um neue potentielle Inhibitoren für die Kinasen, die an das CSN assoziiert sind, zu identifizieren, wurde ein *in silico* Screening mit Curcumin und Emodin durchgeführt.

Diese Strukturen sind bereits bekannte Inhibitoren für die CK2 und PKD [39]. Die Suche wurde in der institutsinternen Datenbank durchgeführt, die ~ 4 Millionen Substanzen (~ 141 Millionen Konformere) enthält. Ein 3D-Überlagerungsalgorithmus wurde in der Arbeitsgruppe entwickelt [15], um die Strukturen der bereits bekannten Inhibitoren mit denen in der Datenbank zu vergleichen (Abb. 21 A). Der Vorteil eines 3D-Vergleichs ist das Auffinden von Strukturen, die durch die Unterschiede im Grundgerüst als „scaffold hopper“ bezeichnet werden und durch 2D-Suchen nicht gefunden werden können, da der Tanimoto-Koeffizient, der als Ähnlichkeitsmatrix für zwei Moleküle gilt, in den meisten Fällen kleiner als der Grenzwert von 0,85 ist. Durch eine Vielzahl von Einstellungsmöglichkeiten, wie der Größe des Moleküls, der Anzahl der überlagerten Atome und der Anzahl der gleichen Atome, kann eine sehr spezifische Suche durchgeführt werden.

A



B

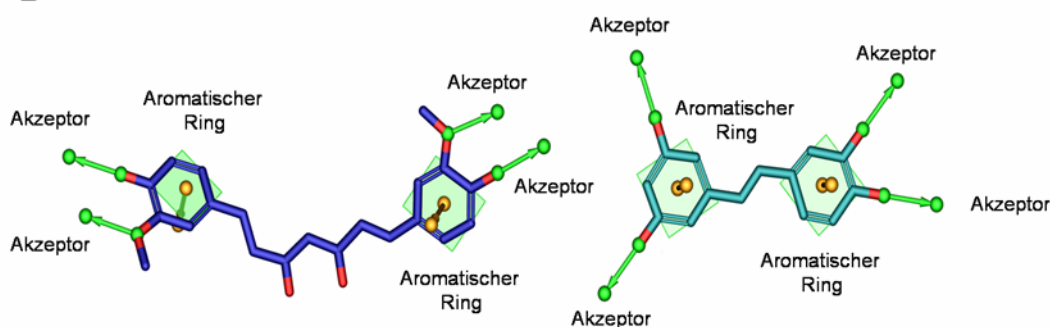


Abbildung 21: 3D-Überlagerung und 2D-Vergleich von Curcumin und Piceatannol.

A Die Leitstruktur Curcumin (blau) wurde mittels eines 3D-Superpositionsalgorithmus mit der Struktur von Piceatannol (grün) überlagert. **B** Dargestellt ist ein Vergleich von Curcumin und Piceatannol aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften. Anhand dieser Informationen wird der in Tabelle 10 dargestellte Tanimoto-Koeffizient berechnet. Rot: Sauerstoff-Atome

Weiterhin wurden die chemischen Eigenschaften (2D) der Leitstrukturen mit denen aus der Datenbank verglichen (Abb. 21 B), anhand derer der Tanimoto-Koeffizient

und der 3D-Zähler berechnet wurden. Basierend auf den unterschiedlichen Leitstrukturen und dem berechneten Tanimoto-Koeffizienten konnten die in der Datenbank gefundenen Substanzen in zwei Gruppen aufgeteilt werden (Tab. 10). Die Moleküle der ersten Gruppe wurden durch die Datenbanksuche mit Curcumin gefunden und die Substanzen der zweiten Gruppe sind der Leitstruktur Emodin zugeordnet.

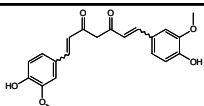
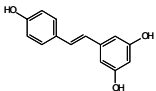
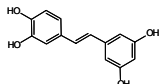
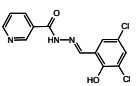
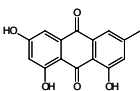
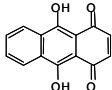
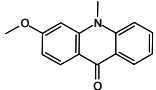
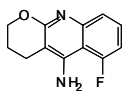
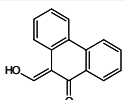
Name	2D-Struktur	Tanimoto-Koeffizient	3D-Zähler
Curcumin-ähnlich			
Curcumin		1,0	100
Resveratrol		0,7	52,7
Piceatannol		0,7	54,2
BTB00363		0,7	40,4
Emodin-ähnlich			
Emodin		1,0	100
BTB 14431		0,9	91,9
JFD02836		0,9	85,6
SEW 04213		0,8	85,5
JFD03665		0,8	76,7

Tabelle 10: Unterteilung der potentiellen Inhibitoren für die CSN-assoziierten-Kinasen. Die Strukturen, die in der Datenbank während des *in silico* Screenings gefunden wurden, konnten in zwei Gruppen (Curcumin-ähnlich und Emodin-ähnlich), abhängig von der verwendeten Leitstruktur, unterteilt werden. Die doppelte Linie markiert den Grenzwert (Tanimoto-Koeffizient < 0,85), der bei 2D-Ähnlichkeiten normalerweise gesetzt wird, um die Treffer zu

limitieren. Ausserdem ist der berechnete 3D-Zähler angegeben (% überlagerter Atome * e^{-rmsd}).

Die so identifizierten Substanzen wurden anschließend in das aktive Zentrum der CK2 gedockt, um die Bindungsaffinität der einzelnen Liganden abzuschätzen. In der Protein-Datenbank (PDB) ist eine Kristallstruktur der CK2 im Komplex mit Emodin abgelegt (1F0Q). Als Referenzligand konnte daher die Leitstruktur Emodin verwendet werden. In der Abbildung 22 ist exemplarisch das Docking-Ergebnis für die Leitstrukturen Emodin und Curcumin dargestellt.

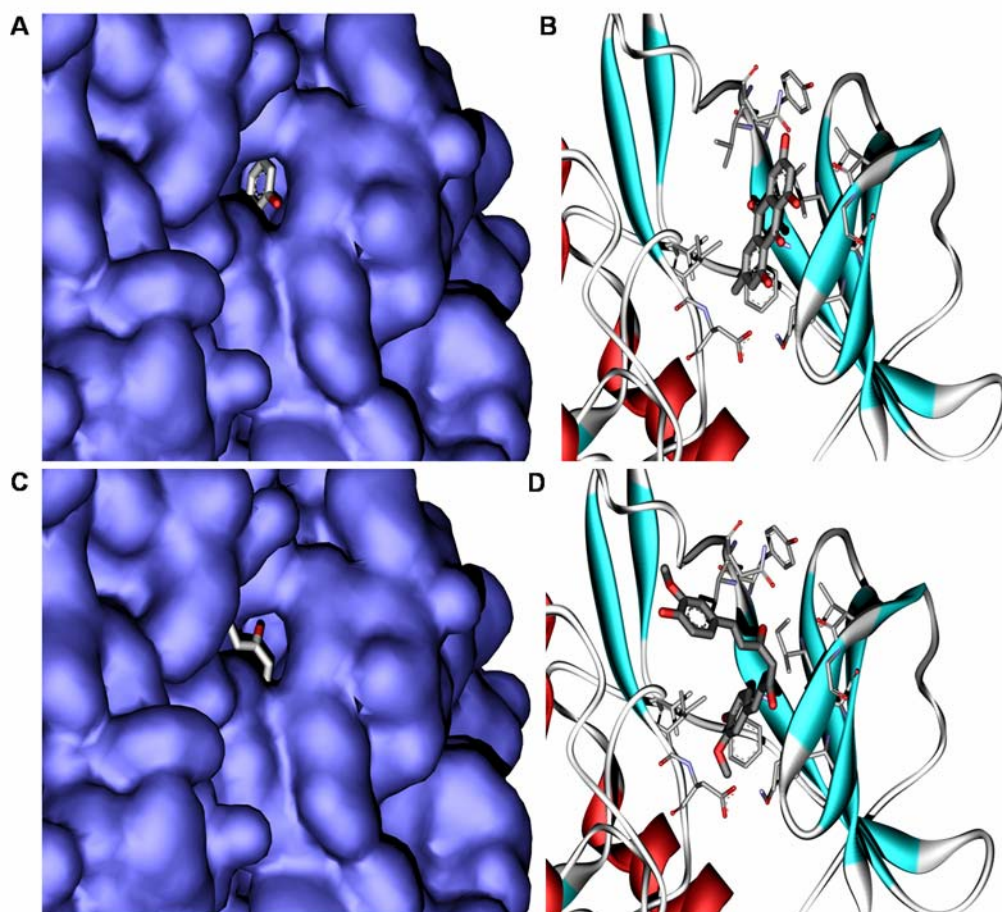


Abbildung 22: Docking-Ergebnisse für Emodin und Curcumin.

Die Moleküle Emodin (A und B) und Curcumin (C und D) wurden mit dem Docking-Programm GOLD in das aktive Zentrum der CK2 gedockt. A und C zeigen die Oberfläche des Proteins. Der Inhibitor ist nur ausschnittsweise zu erkennen. B und D zeigen die 3D-Struktur des Proteins mit dem Inhibitor (dunkelgrau). Ausserdem sind die Seitenketten der Aminosäuren dargestellt, die sich im Umkreis von 5 Å um den Liganden befinden.

Für alle Liganden, auch für den Referenzliganden Emodin, wurde die Bindungsenergie berechnet. Die Ergebnisse in Tabelle 11 zeigen, dass alle Liganden ein $\Delta G_{\text{binding}}$ zwischen -28 und -35 kJ/mol besitzen, was ähnlich der Bindungsenergie des Referenzliganden ist, der bereits als Bindungspartner der CK2 identifiziert wurde. Eine ähnliche Wirkung der potentiellen Inhibitoren auf die CK2 ist daher wahrscheinlich, auch wenn die berechneten Tanimoto-Koeffizienten unterhalb des Grenzwertes liegen.

Name	$\Delta G_{\text{binding}}$ [kJ/mol]
Curcumin-ähnlich	
Curcumin	-33,17
Resveratrol	-34,84
Piceatannol	-32,74
BTB00363	-33,12
Emodin-ähnlich	
Emodin	-31,12
BTB 14431	-29,52
JFD02836	-33,94
SEW 04213	-28,96
JFD03665	-35,69

Tabelle 11: Bindungsaffinitäten für die potentiellen Kinaseinhibitoren.

Die Substanzen wurden an die 3D-Struktur von der CK2 gedockt. Als Referenzligand für die Bindungsstelle wurde der Inhibitor Emodin verwendet (1F0Q). Gezeigt sind die berechneten Bindungsenergien ($\Delta G_{\text{binding}}$).

Außerdem wurden die identifizierten Substanzen hinsichtlich der Lipinski-Regeln und verschiedener Toxikologiemodelle untersucht (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zeigten, dass keine niedermolekulare Substanz mehr als eine der Lipinski-Regeln gebrochen hat und auch mittels der Toxikologiemodelle als harmlos (nicht kanzerogen) einzustufen sind.

4.1.2 Kinaseassay zur Bestimmung der inhibitorischen Wirkung der Treffer auf die CSN-assoziierten-Kinasen

Es wurden insgesamt 35 Moleküle aus der Datenbank als Treffer eingestuft und in Kinaseassays auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht. In diesen Analysen wurde rekombinante CK2, PKD oder der aufgereinigte CSN-Komplex in Gegenwart von [γ - ^{32}P] und 50 oder 200 μM des potentiellen Inhibitors inkubiert. Insgesamt haben 7 von 35 Molekülen eine deutliche Hemmung der Kinasen in dem gewählten Konzentrationsbereich (50 oder 200 μM) gezeigt (siehe Tab. 20 im Anhang). Diese sieben Substanzen sind in diesem Teil der Arbeit gezeigt und wurden genauer untersucht. Von diesen sieben Substanzen waren drei aus der Gruppe der Curcumin-ähnlichen und vier aus der Gruppe der Emodin-ähnlichen Strukturen (Tab. 10 + 11).

Im Folgenden wurden die IC_{50} -Werte für diese sieben Substanzen mit rekombinanter CK2, PKD und dem aufgereinigten CSN-Komplex berechnet. Die Kinaseassays wurden in der Anwesenheit von verschiedenen Inhibitor Konzentrationen durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Proben mittels SDS-PAGE und nachfolgender Autoradiographie auf Kinase-Hemmung durch Analyse der c-Jun-Phosphorylierung analysiert. Diese Kinaseaktivität wurde densitometrisch ausgewertet. Exemplarisch sind in Abbildung 23 die Ergebnisse von Piceatannol (Curcumin-ähnlich) und BTB14431 (Emodin-ähnlich) dargestellt.

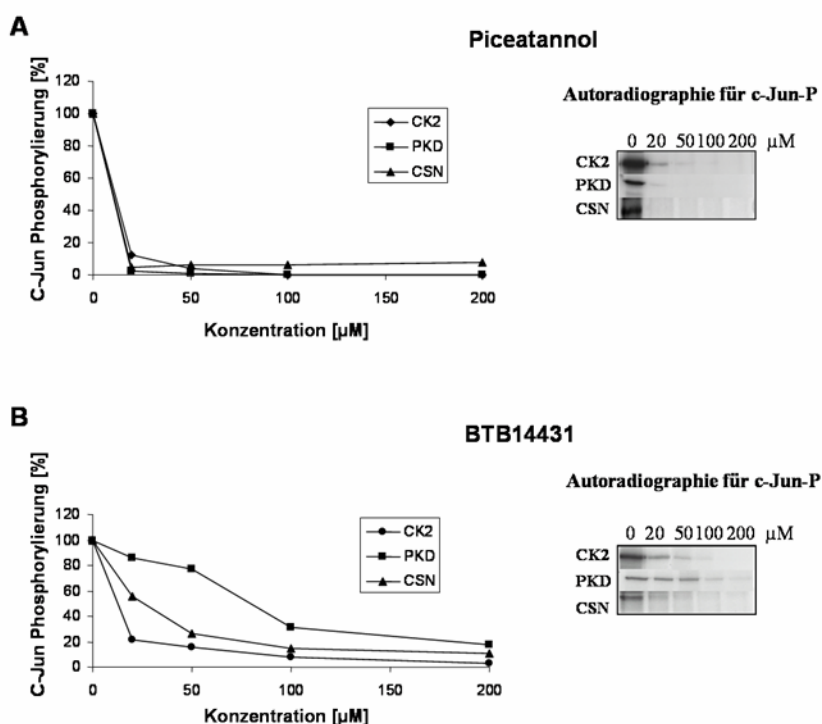


Abbildung 23: Messung der c-Jun-Phosphorylierung in Anwesenheit von Piceatannol und BTB14431.

Dargestellt ist die Hemmung der an das CSN-assoziierten-Kinasen durch die von Curcumin und Emodin abgeleiteten Inhibitoren *in vitro*. **A** Piceatannol, identifiziert durch eine Datenbanksuche mit Curcumin als Leitstruktur und **B** BTB14431, eine Struktur, die durch ein *in silico* Screening mit Emodin gefunden wurde. Rekombinante CK2, PKD und aus Erythrozyten aufgereinigtes CSN wurden verwendet, um das Substrat c-Jun *in vitro* zu phosphorylieren. In der ersten Spalte der Autoradiographie (0) wurde kein Inhibitor zugegeben. Piceatannol (**A**) und BTB14431 (**B**) wurden anschließend in aufsteigender Konzentration zugegeben (20, 50 100 und 200 µM). Die gezeigten Autoradiographien wurden densitometrisch ausgewertet. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängig durchgeführte Experimente.

Die Werte, die sich aus der densitometrischen Auswertung der Autoradiographie ergaben, wurden gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Anhand dieser Kurven wurden die IC₅₀-Werte berechnet, die in der Tabelle 12 zusammengefasst sind. Die Werte für Curcumin, Resveratrol und Emodin waren bereits aus der Literatur bekannt [39]. Die berechneten IC₅₀-Werte zeigen, dass die Curcumin-ähnlichen Strukturen eine stärkere Affinität zur PKD haben, wohingegen die Emodin-ähnlichen Moleküle effizienter bei der Hemmung der CK2-Aktivität sind. In den meisten Fällen ist der IC₅₀-Wert, der für den aufgereinigten CSN-Komplex berechnet wurde, niedriger als

für die rekombinanten Kinasen. Da der Kurvenverlauf durch die anfängliche starke Abnahme der c-Jun-Phosphorylierung ungünstig für die Berechnung des IC_{50} -Wertes ist (Abb. 23), könnten die wahren IC_{50} -Werte noch wesentlich niedriger liegen.

Inhibitor	IC_{50} CK2 [μ M]	IC_{50} PKD [μ M]	IC_{50} CSN [μ M]
Curcumin-ähnlich			
Curcumin	11,8	4,1	2,6 *
Resveratrol	51,0	17,6	32,1 *
Piceatannol	2,5	0,5	1,7
BTB00363	332,7	117,7	188,6
Emodin-ähnlich			
Emodin	22,7	94,5	4,4 *
BTB14431	6,4	68,9	21,0
JFD02836	19,9	39,7	54,1
SEW04213	37,9	185,9	4,8
JFD03665	5,9	154,9	19,8

* [39]

Tabelle 12: Bestimmung der IC_{50} -Werte anhand von Kinaseassays.

Es wurden die IC_{50} -Werte für die Hemmung der rekombinanten CK2, PKD und des aufgereinigten CSN-Komplexes durch die Gruppe der Curcumin- und Emodin-ähnlichen berechnet. Die zwei Gruppen wurden auf der Basis der unterschiedlichen Leitstrukturen gebildet (Tab. 10). Die Kinaseassays wurden, wie bereits beschrieben (Kapitel 3.4.6), durchgeführt. Zum Vergleich sind für Curcumin, Emodin und Resveratrol IC_{50} -Werte aus der Literatur angegeben.

4.1.3 Einfluss der Kinaseinhibitoren auf die Stabilität von c-Jun und p53

Da die Behandlung von Zellen mit Curcumin oder Emodin zu einer Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Proteolyse von c-Jun führt [39, 48], wurde getestet, ob HeLa-Zellen, die mit den neuen Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen (50 oder 200 μ M) inkubiert wurden, eine verminderte c-Jun-Konzentration aufweisen. In der Westernblot-Analyse zeigte sich, dass Piceatannol, Resveratrol (Curcumin-ähnlich),

BTB14431 und JFD02836 (Emodin-ähnlich) konzentrationsabhängig eine deutliche Reduktion des intrazellulären c-Jun-Spiegels auslösen (Abb. 24 A).

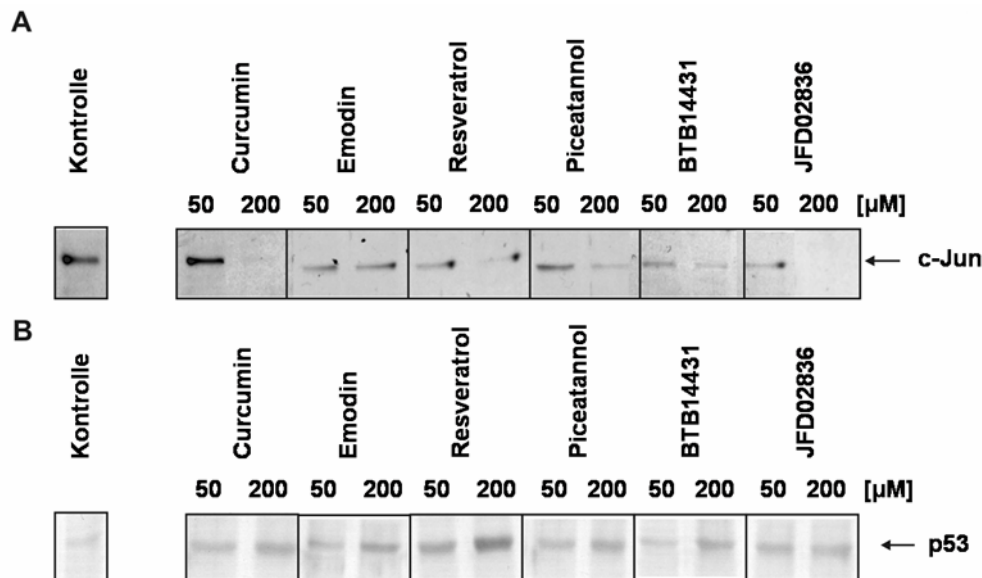


Abbildung 24: Effekt der von Curcumin und Emodin abgeleiteten Inhibitoren auf die Stabilität von c-Jun und p53.

Die eingesetzten Inhibitoren beeinflussen die Stabilität von c-Jun und p53 in HeLa- oder B8-Zellen. HeLa-Zellen (A) oder B8-Zellen (B) wurden für 4 h mit den Inhibitoren Emodin, Resveratrol, Piceatannol, BTB14431 und JFD02836 inkubiert (jeweils 50 und 200 μ M). In der ersten Spalte (Kontrolle, A und B) wurde kein Inhibitor zugegeben. Die Proteine der Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Westernblots wurden mit anti-c-Jun und anti-p53 Antikörper untersucht.

Aus der Literatur ist ebenfalls bekannt, dass Curcumin p53 gegenüber dem intrazellulären, Ubiquitin-abhängigen Abbau stabilisieren kann [44]. Daher sollte untersucht werden, ob die neuen Inhibitoren der CSN-assoziierten-Kinasen ebenfalls zu einem Anstieg der intrazellulären p53-Konzentration führen. Für diesen Versuch wurden murine B8-Fibroblasten, die das p53-Wildtyp-Protein exprimieren [140], mit den Inhibitoren in zwei verschiedenen Konzentrationen (50 oder 200 μ M) behandelt. Anschließend wurden die Zelllysate mittels Westernblot und einem anti-p53 Antikörper analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass alle getesteten Inhibitoren eine Stabilisierung von p53 herbeiführen und damit die Konzentration erhöhen (Abb. 24 B). Resveratrol zeigt bei einer Konzentration von 200 μ M den größten Effekt auf die Stabilisierung des Tumorsuppressors (Abb. 24 A).

4.1.4 Effekt der Kinaseinhibitoren auf die Zellvitalität und die Auslösung von Apoptose

Für Emodin, Curcumin und Resveratrol wurde ein p53-abhängiger Mechanismus zur Auslösung der Apoptose beschrieben [141, 142]. Daher sollte in den folgenden Experimenten nachgewiesen werden, ob die neu gefundenen Inhibitoren ebenfalls Apoptose auslösen können. Untersuchungen bezüglich der Zytotoxizität von Curcumin-Analoga wurden in einer Studie bereits nachgewiesen. Dabei wurde die Fähigkeit zur Auslösung von Apoptose in etwa 60 verschiedenen Tumorzelllinien gemessen und Effekte wurden in nahezu allen Zelllinien nachgewiesen [143]. In den meisten Studien wird die Induktion von Apoptose lediglich durch die Oxidierung von Tetrazolium im MTT-Test analysiert. Die im MTT-Test erhobenen Daten sind jedoch nur ein sehr indirektes Maß für Zellproliferation. Diese Analyse wurde in dieser Arbeit daher durch die Messung der DNA-Fragmentierung, der Messung der Caspase-Aktivität und die Annexin-V-FITC / PI Doppelfärbung [144] ergänzt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Zellvitalität mit dem MTT-Test untersucht, der den prozentualen Anteil an irreversibel geschädigten Zellen nach der Behandlung mit den Inhibitoren angibt. Durch die Zugabe von Curcumin und BTB14431 in einer Konzentration von 20 μM nahm die hierdurch analysierte Zellvitalität um ca. 75 % ab. Eine deutliche Minderung der lebenden Zellen nach der Zugabe von Emodin, Resveratrol oder Piceatannol konnte erst bei hohen Inhibitor-Konzentrationen (50 μM) festgestellt werden (Abb. 25)

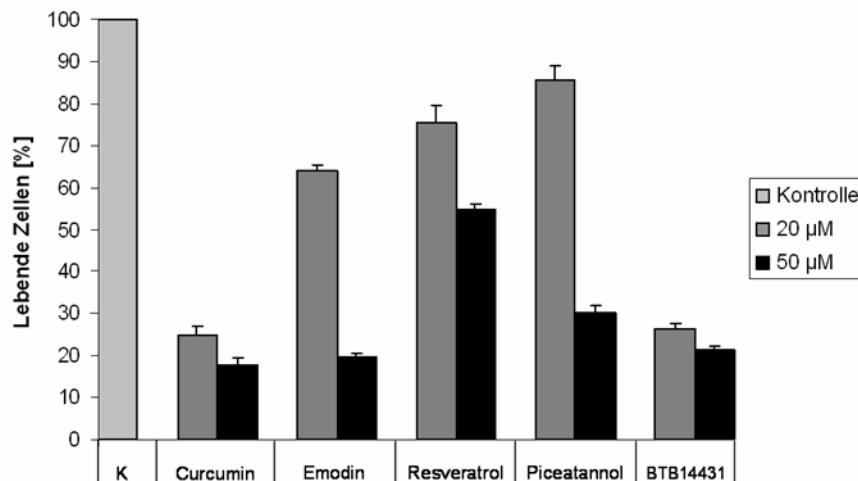


Abbildung 25: MTT-Test zur Untersuchung der Zellvitalität nach der Behandlung mit den Kinaseinhibitoren.

HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (20 oder 50 µM) von Curcumin, Emodin, Resveratrol, Piceatannol oder BTB14431 für 24 h inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit 0,1 % DMSO (K) behandelt. Das Balkendiagramm zeigt die relative MTT-Aktivität nach Behandlung mit den Inhibitoren.

Um zu testen, ob der Zelltod, und insbesondere durch Apoptose oder Nekrose, ausgelöst wurde, wurde zusätzlich eine Annexin-V-FITC / PI Doppelfärbung durchgeführt, die getrennte Analyse apoptotischer und nekrotischer Zellen erlaubt. Nach einer Inkubation von 24 h weisen die HeLa-Zellen, die mit den Inhibitoren Curcumin, Piceatannol und BTB14431 inkubiert wurden, eine große Anzahl von apoptotischen Zellen auf (Abb. 26 B). Emodin- und Resveratrol-inhibierte Kulturen wiesen auch bei hohen Konzentrationen (50 µM) eine niedrigere Apoptoserate auf. Bei Piceatannol (Abb. 26 A) und Curcumin zeigten sich bei hohen Konzentration (50 µM) erhöhte Anteile von nekrotischen Zellen, wohingegen der Inhibitor BTB14431 auch bei einer Konzentration von 50 µM nur einen Anteil von 16 % nekrotischer Zellen induzierte (Abb. 26 A).

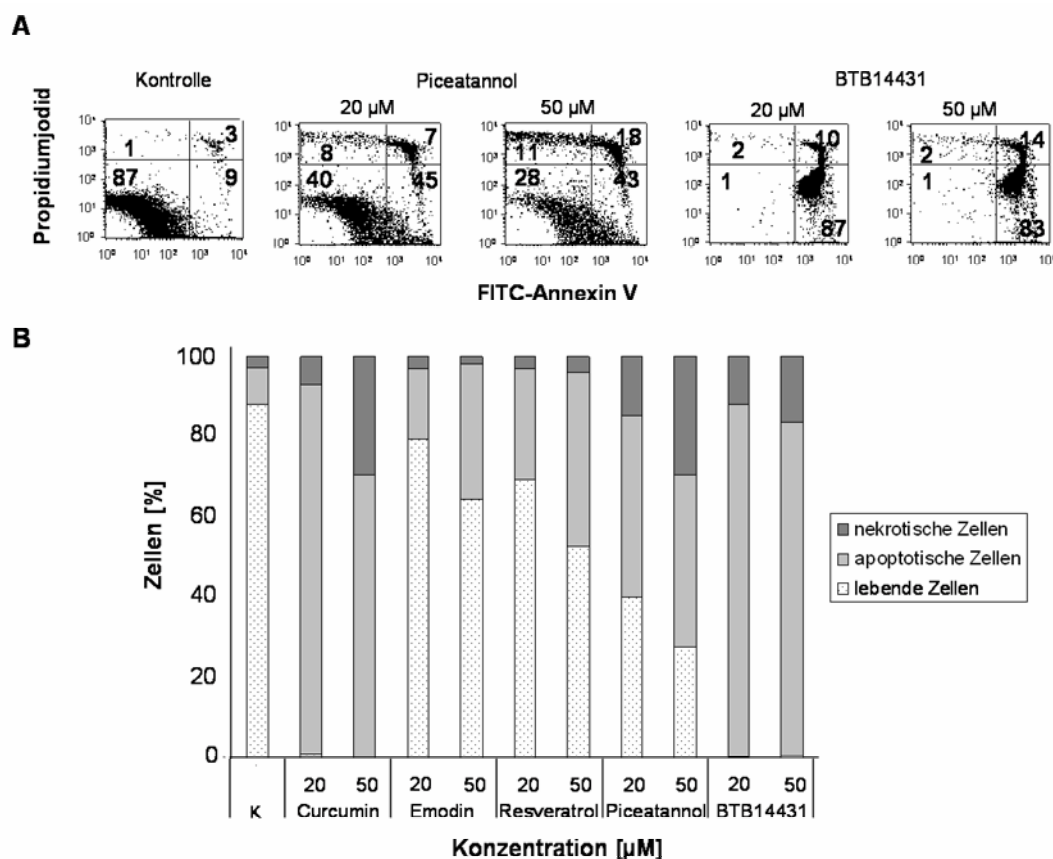


Abbildung 26: Apoptose oder Nekrose: Annexin-V-FITC / Propidiumjodid (PI) Doppelfärbung von HeLa-Zellen nach der Behandlung mit den CSN-Kinaseinhibitoren.

HeLa-Zellen wurden mit Medium, welches 0,1 % DMSO (K) oder die von Curcumin und Emodin abgeleiteten Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen (20 oder 50 µM) enthielt, inkubiert. Nach 24 h wurde der Zelltod auf Einzelzellniveau durch Färbung mit Annexin-V-FITC und Gegenfärbung mit Propidiumjodid detektiert. **A** Repräsentative Daten für Piceatannol und BTB14431. Die Zahlen zeigen den prozentualen Anteil an Zellen in jedem Quadranten an: unten links: FITC⁻/PI⁻, lebende Zellen; unten rechts: FITC⁺/PI⁻, apoptotische Zellen; oben links: FITC⁻/PI⁺, spät-nekrotische Zellen; oben rechts: FITC⁺/PI⁺, spät-apoptotische oder nekrotische Zellen. **B** Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale Verteilung der nekrotischen, apoptotischen und lebenden Zellen nach der Behandlung mit Curcumin, Emodin, Resveratrol, Piceatannol oder BTB14431.

Anschließend wurde die Caspase-Aktivität in murinen B8-Fibroblasten gemessen. Die Ergebnisse in Abbildung 27 zeigen, dass bis auf Resveratrol, alle getesteten niedermolekularen Substanzen einen Anstieg in der Caspase-Aktivität auslösen. Der größte Anstieg in der Caspase-Aktivität wurde bei 50 µM Curcumin gemessen. Piceatannol und BTB14431 (jeweils 50 µM) haben die Caspase-Aktivität um das Fünffache gesteigert, wohingegen die Substanzen SEW04213 und JFD02836 nur einen leichten Effekt bei einer Konzentration von 200 µM zeigten.

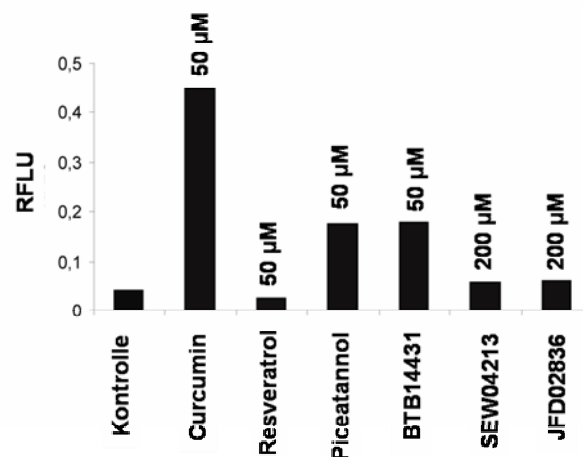


Abbildung 27: Messung der Caspase-Aktivität nach der Behandlung der Zellen mit den von Curcumin und Emodin abgeleiteten Inhibitoren.

Die Inhibitoren der CSN-assoziierten-Kinasen induzieren Apoptose in B8-Zellen. Durch die Verwendung eines DEVD-Peptides wurde die Caspase-3/7-Aktivität in murinen Maus B8-Fibroblasten bestimmt. Die Zellen (10^4 /well) wurden mit den Inhibitoren Curcumin, Resveratrol, Piceatannol, BTB14431, SEW04213 und JFD02836 für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach 3 h Inkubationszeit mit dem Caspase-3/7-Substrat bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenz (RFLU: Relative Fluoreszenz Lichteinheiten, relative fluorescent light units) bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm gemessen.

Um die zuvor gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Apoptoseinduktion zu verifizieren, wurde in einem weiteren Versuch untersucht, ob nach Zugabe der Inhibitoren zu HeLa-Zellen eine DNA-Fragmentierung messbar ist. Dieses Ereignis findet in der späten Phase der Apoptose statt und wurde nach einer Inkubation von 48 h gemessen. Die Zellen wurden mit Curcumin, Emodin, Resveratrol, Piceatannol, BTB14431 oder JFD02836 in verschiedenen Konzentrationen (20 oder 50 µM) behandelt. Bis auf die Probe mit der Substanz JFD02836 wurde in allen Experimenten Apoptose ausgelöst (Abb. 28 B). Die Anzahl der hypodiploiden (apoptotischen) Zellen, die in Abbildung 28 A jeweils über dem Marker der repräsentativ dargestellten Ergebnisse angegeben ist, nahm bei Curcumin, Emodin, Resveratrol und Piceatannol konzentrationsabhängig zu, während sie bei BTB14431 konstant blieb.

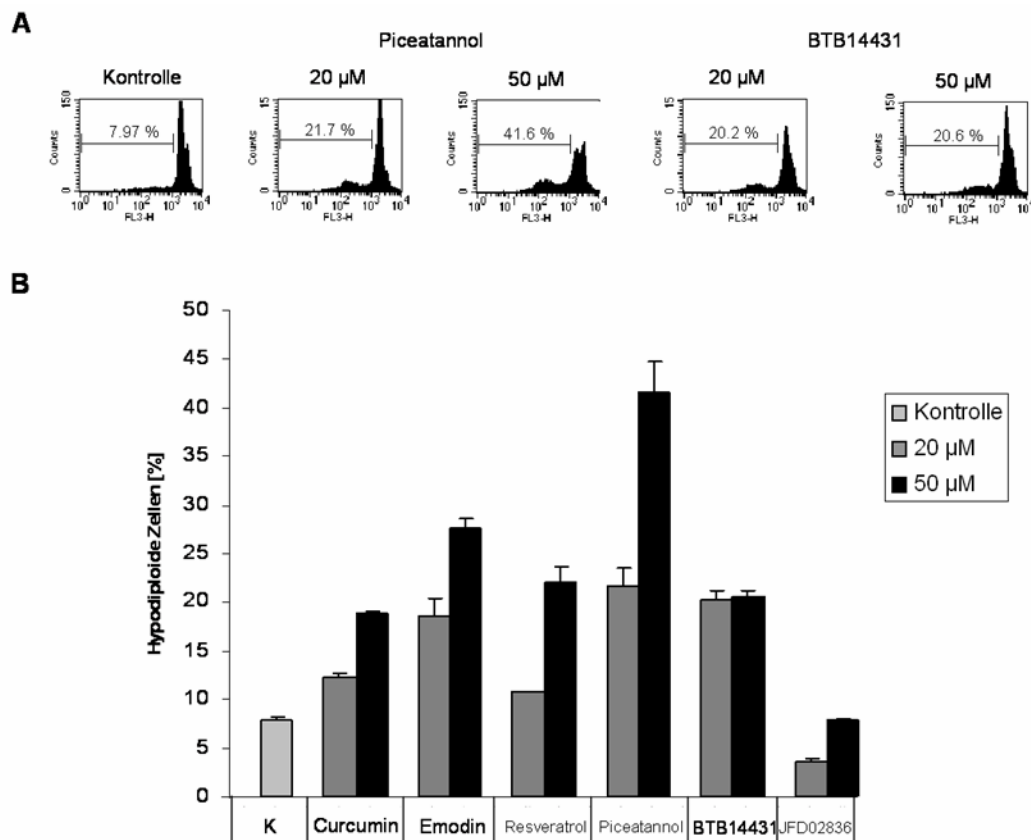


Abbildung 28: DNA-Fragmentierung in HeLa-Zellen nach 48 h Inkubation mit den Kinaseninhibitoren ist konzentrationsabhängig.

A Dargestellt sind repräsentative Daten für Piceatannol und BTB14431 (jeweils 20 und 50 μ M). Als Kontrolle (K) wurden Zellen mit 0,1 % DMSO inkubiert. Die Zellen, die unter dem Marker liegen, geben die hypodiploiden (apoptotischen) Zellen an. **B** Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der hypodiploiden Zellen nach der Behandlung mit den Inhibitoren Curcumin, Emodin, Resveratrol, Piceatannol, BTB14431 oder JFD02836 in den Konzentrationen 20 oder 50 μ M.

Die dargestellten Ergebnisse des *in silico* und *in vitro* Screenings zeigen, dass neue effektive Inhibitoren für die CSN-assoziierten-Kinasen gefunden werden konnten, die p53 stabilisieren, die c-Jun-Phosphorylierung hemmen und einen apoptotischen Zelltod auslösen. [145]

4.2 BETULINSÄURE-ANALOGA

Im zweiten Modellprojekt wurde der Naturstoff Betulinsäure (BA) untersucht. Obwohl dieser bereits seit langer Zeit als potentiell Tumortherapeutikum diskutiert wird [95], konnte der Wirkmechanismus jedoch noch nicht geklärt werden [96]. Da der BA-induzierte Zelltod bereits als p53- und CD95-unabhängig beschrieben wurde [97], wurde zunächst die Regulation des mitochondrialen Signalwegs durch die BA-induzierte Apoptose untersucht. Anschließend wurde mit BA als Leitstruktur ein *in silico* Screening durchgeführt und die Ergebnisse schließlich in einem *in vitro* Screening verifiziert.

4.2.1 Untersuchung des Wirkmechanismus der Betulinsäure

Die Betulinsäure ist ein Naturstoff, der das Grundgerüst eines pentazyklischen Triterpens besitzt. In Abbildung 29 sind die 3D-Struktur der BA und die dazugehörigen Konformere dargestellt.

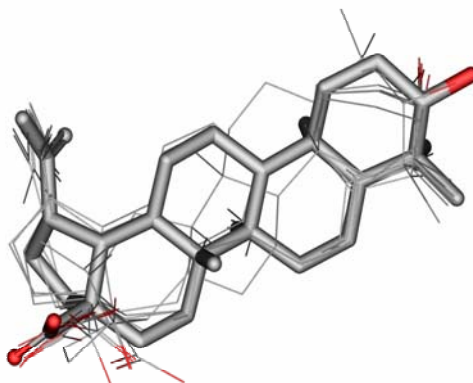


Abbildung 29: 3D-Struktur von Betulinsäure (BA) und die dazugehörigen Konformere.
Rot: Sauerstoff-Atome

Zunächst wurde der Zelltod untersucht, der durch BA ausgelöst wird. Dazu wurden die Bindung von Annexin-V-FITC und die Aufnahme von Propidiumjodid (PI) gemessen. BA induzierte die frühe Bindung von Annexin-V-FITC, was als Charakteristikum der Apoptose gilt, da so die Translokation des Membran-Phospholipids Phosphatidylserin von der Innen- zur Außenseite der Plasmamembran detektiert werden kann. Da

zu diesem Zeitpunkt keine Aufnahme von PI festgestellt werden konnte, ist der ausgelöste Zelltod als apoptotisch zu bezeichnen (Abb. 30).

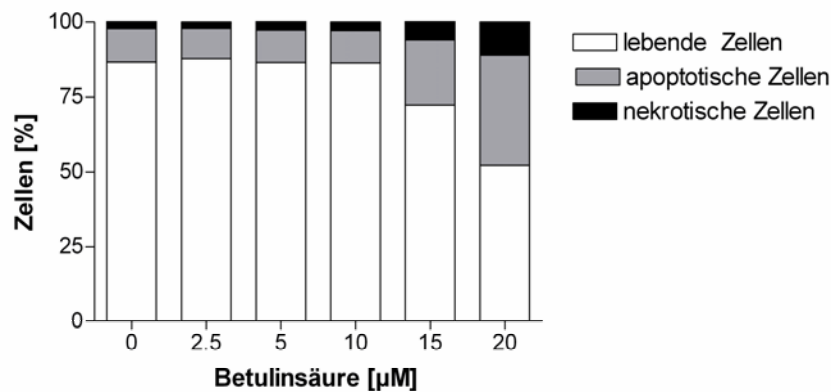


Abbildung 30: Der durch BA ausgelöste Zelltod entspricht dem Apoptose Phänotypen. Jurkat A3 Zellen wurden mit BA in den angegebenen Konzentrationen für 24 h inkubiert und mit Annexin-V-FITC / PI doppelt gefärbt. Die Ergebnisse wurden mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die Werte sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Da die Wirkung vieler Antikrebsmedikamente, wie z.B. Nukleosid-Analoga [146], Anthrazykline [147] oder Taxane [148] über die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert wird, wurden im Folgenden anti- und pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder und Komponenten des Apoptosoms auf ihre Rolle in der BA-induzierten Apoptose untersucht.

4.2.1.1 Wirkung von Bcl-2 und Bcl-x_L auf den Betulinsäure-induzierten Zelltod

Zuerst sollte getestet werden, ob die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 oder Bcl-x_L eine inhibitorische Wirkung auf die Betulinsäure-induzierte Apoptose haben. Es wurden Jurkat Zellen (akute lymphoblastische Leukämie der T-Linie), die entweder Bcl-2 oder Bcl-x_L überexprimieren, sowie BJAB Burkitt-like Lymphom Zellen, die Bcl-x_L überexprimieren, mit Betulinsäure behandelt. Nach 48 h wurde die Wirkung von BA auf das mitochondriale Membranpotential gemessen. Bcl-2 und Bcl-x_L führten zu einem geringeren Abfall des mitochondrialen Membranpotentials in Jurkat und BJAB Zellen, wohingegen Bcl-x_L die Jurkat Zellen nicht vor dem BA-induzierten Zelltod schützen konnten (Daten nicht gezeigt). Mittels Durchflußzytometrie wurde die Frag-

mentierung genomischer DNA durch Betulinsäure in einem weiteren Versuch in denselben Zelllinien auf Einzelzellniveau getestet. Ab einer Konzentration von 10 μM BA konnte signifikant Apoptose gemessen werden. Bei der höchsten Konzentration (20 μM) konnte eine Apoptoserate von $\sim 90\%$ festgestellt werden (Abb. 31). In den Jurkat Zellen, die Bcl-2 überexprimieren, wurde eine leichte Abnahme in der Anzahl der hypodiploiden (apoptotischen) Zellen auf 71,8 %, im Vergleich zu 92,3 % in den Kontrollzellen (Jurkat mock), gemessen (Abb. 31 A). Die Überexpression von Bcl- x_L hatte keinen signifikanten Effekt in den Jurkat Zellen (Abb. 31 B), während eine leichte Abnahme in der Apoptoserate in den BJAB Zellen zu verzeichnen war (BJAB Bcl- x_L : 71,7 %, BJAB mock: 89,3 %, Abb. 31 C).

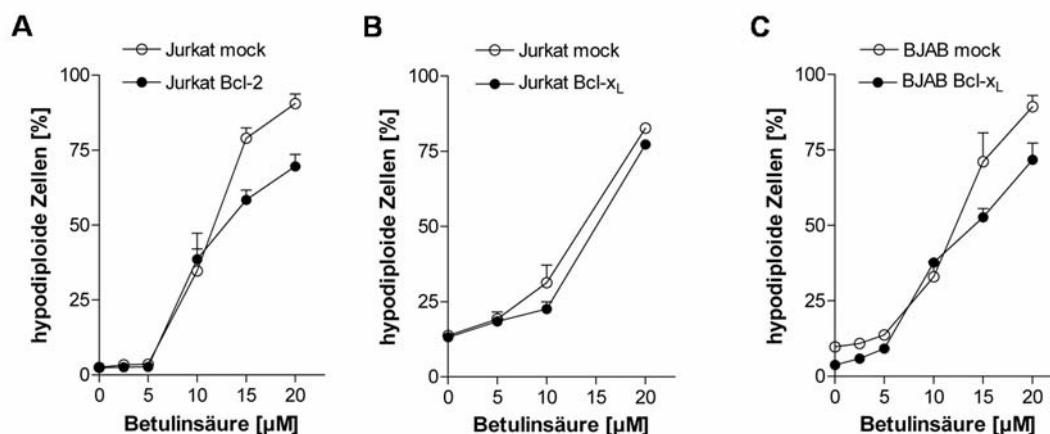


Abbildung 31: Betulinsäure (BA) induziert Apoptose in Jurkat und BJAB Zellen.

Die Apoptose, die durch Betulinsäure ausgelöst wird, ist geringfügig von Bcl-2 abhängig und von Bcl- x_L unabhängig. Jurkat und BJAB Zellen wurden mit BA in den angegebenen Konzentrationen für 72 h inkubiert. Die Werte sind in Prozent von hypodiploiden Zellen angegeben, die die Anzahl an apoptotischen Zellen widerspiegeln. Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchung der DNA-Fragmentierung in **A** Jurkat mock (Kontrollzellen) und Jurkat Bcl-2 (Überexpression von Bcl-2), **B** Jurkat mock (ohne Bcl- x_L) und Jurkat Bcl- x_L (mit Bcl- x_L transfiziert) und **C** BJAB mock (ohne Bcl- x_L) und BJAB Bcl- x_L (Wildtyp mit Bcl- x_L). Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

4.2.1.2 Hat die Abwesenheit von Bax und Bak eine Auswirkung auf die Betulin säure-induzierte Apoptose?

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der BA-induzierte Zelltod auf die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak angewiesen ist. Die Fragmentierung der genomischen DNA, durch die Behandlung mit BA, wurde in verschiedenen Zellsystemen durchgeführt. DU145 Prostatakarzinomzellen tragen eine Mutation im bax Gen, die zur Verschiebung des Leserasters (Frameshift) führt. Hierdurch wird ein Stopcodon eingefügt. Die Zellen exprimieren in Folge kein Bax mehr. Diese Zellen wurden mit DU145 Zellen verglichen, die Bax stabil reexprimieren können [149]. Die Bax-defizienten Zellen zeigten, ebenso wie die Zellen mit Bax, einen vergleichbaren Anteil an hypodiploiden Zellen und einen analogen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 32 A + B). Es war kein Unterschied in der Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien und der Prozessierung der Caspasen-9, -3 und -8 im Westernblot erkennbar (Abb. 32 C).

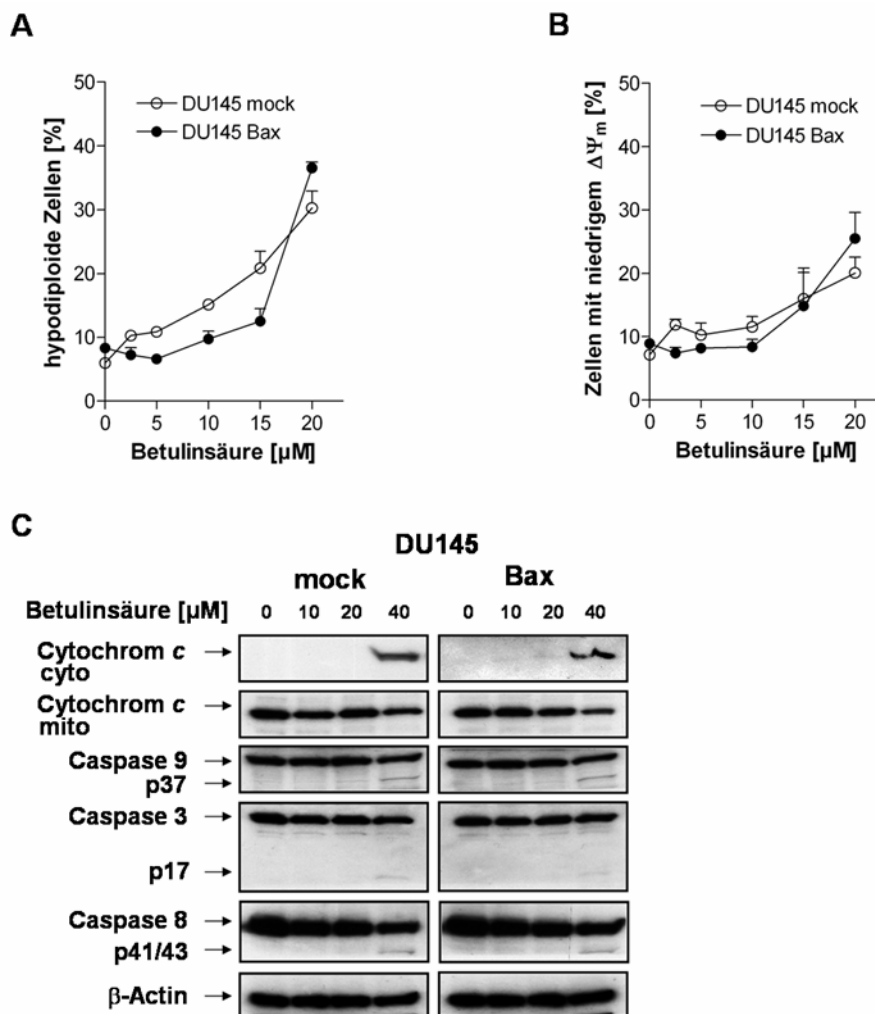


Abbildung 32: Betulinsäure löst Apoptose in DU145 Zellen unabhängig von Bax aus.

A DNA-Fragmentierung (nach 72 h) und **B** die Messung des mitochondrialen Membranpotentials (nach 48 h) wurden in Bax-defizienten (DU145 mock) Zellen und Zellen, die Bax enthalten (DU145 Bax), in den angegebenen Konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse der DNA-Fragmentierung sind in Prozent an hypodiploiden Zellen angegeben, die die Anzahl der apoptotischen Zellen angeben. Die Daten der Messung des mitochondrialen Membranpotentials sind in Prozent an Zellen, die ein erniedrigtes mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) aufweisen, angegeben. Diese Zellen befinden sich in der frühen Phase der Apoptose. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. **C** DU145 Bax-defiziente Zellen (DU145 mock) und Zellen, die Bax enthalten (DU145 Bax), wurden präpariert und einer Westernblot-Analyse bezüglich der Freisetzung von Cytochrom c und der Prozessierung von den Caspasen-3, -8 und -9 nach einer Inkubationszeit von 60 h mit den angegebenen Konzentrationen BA unterzogen. (Der Wester Blot wurde durchgeführt von A. Richter) β -Actin-Nachweis diente als Ladekontrolle.

Um die Funktion von Bak in der BA-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden weitere Versuche in HCT116 Kolonkarzinomzelllinien durchgeführt. Bei HCT116 Zellen, die einen bax Gen *knockout* (HCT116 Bax k.o.) besitzen, zeigte sich eine ver-

minderte Sensitivität bezüglich der Induktion von Apoptose. Die Messung der DNA-Fragmentierung ergab die deutlichste Inhibition der BA-induzierten Apoptose bei den Konzentrationen 5 und 10 μM . Bei den HCT116 wt Zellen, die Bax exprimieren, lag die Apoptoserate bei 18 und 36 % hypodiploider Zellen, wohingegen die Bax k.o. Zellen nur einen prozentualen Anteil von 8 und 14 % apoptotischer Zellen aufwiesen. Bei höheren BA Konzentrationen (15 oder 20 μM) reduzierte sich der Unterschied zwischen den HCT116 wt und HCT116 Bax k.o. Zellen auf 10 %, wobei die maximale Apoptoserate bei dem Wildtyp bei 42 % hypodiploider Zellen lag (Abb. 33).

Die Funktion von Bak wurde im Folgenden in HCT116 Zellen untersucht, die Bax exprimieren bzw. einen Bax k.o. besitzen und durch eine Transfektion mit einem shRNA (*small hairpin* RNA) Konstrukt, dass auf die mRNA von Bak wirkt, einen *knockdown* von Bak aufweisen. Die Runterregulation von Bak in den Bax exprimierenden Zellen (HCT116 Bak k.d.) hatte den gleichen Effekt wie bei den Bax k.o. Zellen und auch der zusätzliche *knockdown* von Bak in den Bax k.o. Zellen (HCT116 Bax k.o. Bak k.d.) ergab keinen zusätzlichen inhibitorischen Effekt, bezogen auf die BA-induzierte Apoptose (Abb. 33). Der Verlust von Bax oder/und Bak rief eine Inhibition der BA-induzierten Apoptose hervor, die aber durch eine höhere BA Konzentration ausgeglichen werden kann.

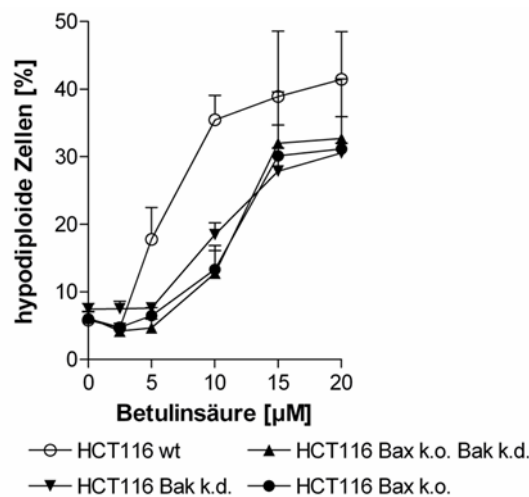


Abbildung 33: Induktion von Apoptose durch Betulinsäure in HCT116.

HCT116 wt (enthalten Bax und Bak) Zellen, Bax-defiziente (HCT116 Bak k.o.) Zellen, Zellen, die shRNA gegen Bak exprimieren (HCT116 Bak k.d.) und Zellen, die sowohl Bax-defizient sind, als auch die shRNA gegen Bak exprimieren (HCT116 Bak k.o. Bak k.d.), wurden für 72 h mit Betulinsäure inkubiert. Apoptose wurde durch die Messung der Fragmentierung von genomischer DNA mittels Durchflußzytometrie untersucht. Die Ergebnisse sind in Prozent an hypodiploiden Zellen angegeben, die die Anzahl der apoptotischen Zellen angeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

In einem weiteren Zellsystem, wurden diese Ergebnisse überprüft. In der murinen embryonalen Fibroblasten Zelllinie (MEF), die den Wildtyp für Bax und Bak enthalten (MEF wt) oder einen Keimbahn *knockout* für Bax (Bax k.o.), Bak (Bak k.o.) oder Bax und Bak (DKO) aufweisen. Apoptose wurde durch die Fragmentierung genomischer DNA auf Einzelzellniveau gemessen. In diesem Zellsystem konnte gezeigt werden, dass die durch BA-induzierte Apoptose völlig unabhängig von Bax und Bak ist. Bei Konzentrationen oberhalb von 5 µM konnte Apoptose bis zu einem Maximum von 49 - 56 % apoptotischer Zellen (20 µM BA) gemessen werden (Abb. 34).

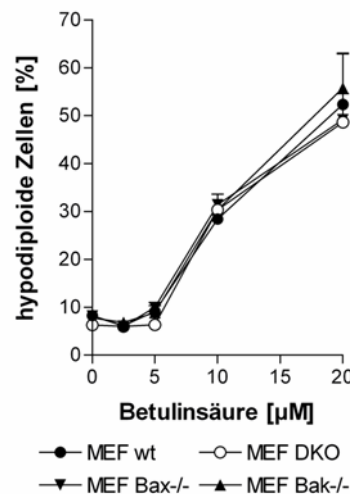


Abbildung 34: Induktion von Apoptose durch Betulinsäure in MEF Zellen.

Murine Fibroblasten (MEF) mit Wildtyp für Bax und Bak (MEF wt) und MEFs Bax k.o. (Bax $-/-$), Bak k.o. (Bak $-/-$) und Bax/Bak Doppelknockout (DKO) wurden ebenfalls für 72 h mit Betulinsäure inkubiert. Apoptose wurde durch die Messung der Fragmentierung von genomischer DNA mittels Durchflußzytometrie untersucht. Die Ergebnisse sind in Prozent an hypodiploiden Zellen angegeben, die die Anzahl der apoptotischen Zellen angeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

4.2.1.3 Der Betulinsäure-induzierte Zelltod ist Caspase abhängig

Der anti-apoptotische Einfluss von Bcl-2 oder Bcl-x_L ist ein Charakteristikum vom regulierten Zelltod, der über den intrinsischen Apoptose Signalweg abläuft [150, 151]. Da dieses bei BA zum größten Teil nicht der Fall ist, BA aber einen apoptotischen Zelltod und keinen nekrotischen Zelltod auslöst (Abb. 35), wurde nun die Funktion der Caspasen bei dem BA-induzierten Zelltod untersucht. Dafür wurden HCT116 wt und HCT116 Bax k.o. Bak k.d. Zellen mit BA in An- und Abwesenheit des Pan-Caspase-Inhibitors zVADfmk inkubiert. Die Zugabe von zVADfmk führte zu einer nahezu vollkommenen Inhibition der BA-induzierten DNA-Fragmentierung (Abb. 35). Der Anteil der hypodiploiden Zellen fiel bei den HCT116 wt Zellen von 84,1 % auf 14,7 % (Abb. 35 A) und von 82,1 % auf 17,6 % bei den HCT116 Bax k.o. Bak k.d. ab (Abb. 35 B). Die BA-induzierte Apoptose ist also Caspase-abhängig, ungeachtet der Bax/Bak-Defizienz.

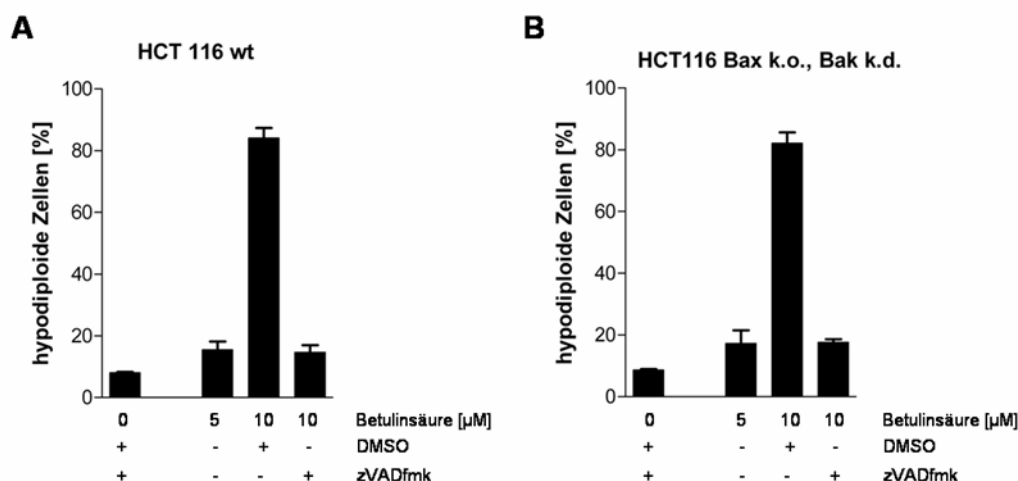


Abbildung 35: Inhibition der Betulinsäure-induzierten DNA-Fragmentierung durch einen Pan-Caspase-Inhibitor.

HCT116 wt (enthalten Bax und Bak) und Bax/Bak doppelt defiziente HCT116 Zellen (Bax k.o., Bak k.d.) wurden mit 5 oder 10 μ M Betulinsäure für 48 h inkubiert. Zellen, die mit 10 μ M BA inkubiert wurden, wurden zusätzlich mit 40 μ M zVADfmk (Pan-Caspase-Inhibitor) oder DMSO (als Kontrolle) kultiviert. Apoptose wurde durch das Messen der Fragmentierung von genomischer DNA mittels Durchflußzytometrie ermittelt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige durchgeführte Experimente.

In einem letzten Versuch soll nun die Rolle des Apoptosom-Komplexes im Bezug auf den BA-induzierten Zelltod untersucht werden. Dafür wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF) mit BA für 72 h inkubiert und die DNA-Fragmentierung mittels Durchflußzytometrie gemessen. MEF Wildtyp (MEF wt), Caspase-9-defiziente (MEF Caspase-9 k.o.) und APAF-1-defiziente (MEF Apaf 1 k.o.) Zellen wurden mit BA in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Der Anteil an hypodiploiden Zellen, bei einer BA Konzentration von 20 μ M, war in den Wildtyp Zellen am höchsten (MEF wt) und sank in den APAF-1-defizienten Zellen auf 52,3 % und in den Caspase-9-defizienten Zellen sogar auf 27,6 % ab (Abb. 36). Diese Ergebnisse zeigen, dass die BA-induzierte Apoptose zum Teil von den Signalkaskaden, die durch das Apoptosom ausgelöst werden, abhängig ist. Ebenfalls kann vermutet werden, dass die Caspase-abhängige Apoptose über einen teils APAF-1 unabhängigen Weg abläuft.

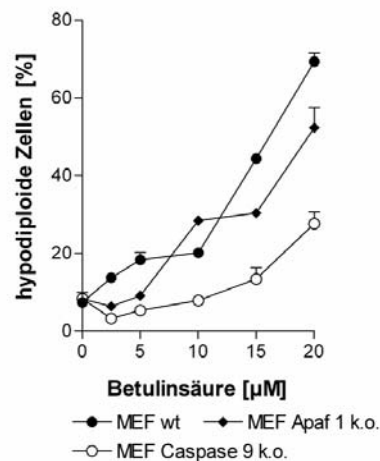


Abbildung 36: Inhibition der Betulinsäure-induzierten DNA-Fragmentierung in APAF-1- und Procaspase-9-defizienten MEF Zellen.

MEF Zellen, die den Wildtyp für APAF-1 und Procaspase-9 besitzen, MEFs ohne APAF-1 (MEF Apaf 1 k.o.) und MEFs von Procaspase-9 k.o. (MEF Caspase-9 k.o.) Mäusen wurden für 72 h mit Betulinsäure in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Apoptose wurde durch das Messen der Fragmentierung von genomischer DNA mittels Durchflußzytometrie ermittelt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass BA-induzierte Apoptose größtenteils unabhängig von den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-x_L abläuft. Der Einfluss von Bax und Bak ist in höheren Konzentrationen vergleichbar mit dem von Bcl-2 und Bcl-x_L im Jurkat und BJAB Zellsystem. Weiterhin scheint der BA-ausgelöste Zelltod von Caspasen und teils von über das Apoptosom ausgelösten Signalen abhängig zu sein.

4.2.2 *In silico* Screening mit Betulinsäure als Leitstruktur

Neben der Untersuchung des Wirkmechanismus wurde mit der Betulinsäure auch ein *in silico* Screening durchgeführt. Eine Moleküldatenbank mit > 4 Millionen Strukturen wurde mit BA als Leitstruktur durchsucht, um niedermolekulare Substanzen zu finden, die eine ähnliche biologische Wirkung aufweisen. Die Suche erfolgte unter Beachtung von chemischen (2D-) und räumlichen (3D-) Ähnlichkeiten. Eine strukturelle Überlagerung, wie sie für alle Moleküle durchgeführt wurde, ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Leitstruktur BA (blau) wurde mit der Substanz NP-009993 (grün), die in der Datenbank gefunden wurde, überlagert.

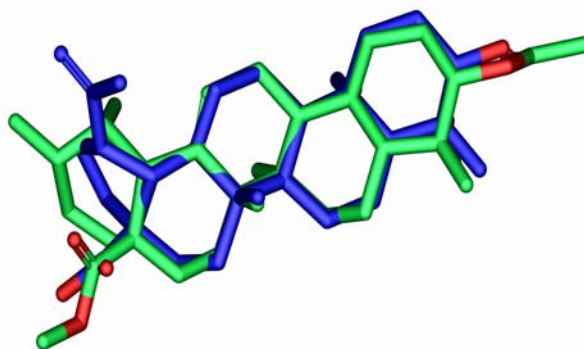


Abbildung 37: 3D-Überlagerung von Betulinsäure (blau) und NP-009993 (Grün).
Rot: Sauerstoffatom.

Die Ergebnisse des *in silico* Screenings sind in Tabelle 13 gezeigt. Alle Treffer dieser Datenbanksuche sind mit der chemischen Struktur (2D), dem korrespondierenden Tanimoto-Koeffizienten (TK) und dem 3D-Zähler (% überlagerter Atome * $e^{-\text{rmsd}}$) angegeben. Da ein TK von > 0,85 auch auf eine ähnliche biologische Aktivität hinweist, werden die Substanzen Ursolsäure, NP-009909, PHAR040741, BAS1279930, NP-010362, BN 10953 und NP-009993 im Folgenden weiter untersucht. Obwohl die Moleküle B-0442-B-10 und B-1000-B-09 einen niedrigeren TK aufweisen (0,70 und 0,61), was auf die strukturellen Unterschiede zwischen Leitstruktur und Treffer zurückzuführen ist, zeigen die 3D-Zähler (~ 57 und 69), dass diese Moleküle vielversprechende Treffer sein könnten (Tab. 13). Außerdem sind Treffer mit abweichendem Grundgerüst („scaffold hopper“) sehr erfolgversprechend bei der Suche nach neuen Wirkstoffen [17].

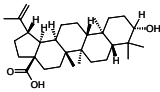
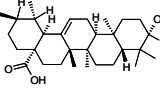
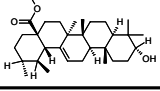
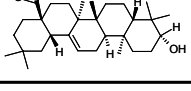
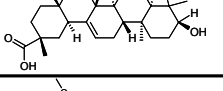
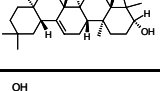
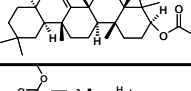
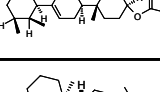
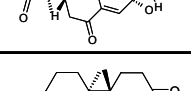
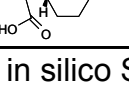
Name	2D-Struktur	2D-Zähler [TK]	3D-Zähler
Betulinsäure		1,0	100
Ursolsäure		0,94	58,35
NP-009909		0,92	50,92
PHAR040741		0,92	43,61
BAS 1279930		0,92	44,73
NP-010362		0,89	49,22
BN 10953		0,86	32,93
NP-009993		0,85	42,84
B-0442-B-10		0,70	56,97
B-1000-B-09		0,61	68,58

Tabelle 13: Ergebnisse des in silico Screenings mit Betulinsäure als Leitstruktur.

Die Strukturen der Betulinsäure und die Treffer sind als 2D-Struktur dargestellt. Ausserdem sind die korrespondierenden Tanimoto-Koeffizienten (TK) und 3D-Zähler (% überlagerter Atome * e^{-rmsd}) angegeben.

Anschließend wurden alle in Tabelle 13 aufgeführten Treffer bezüglich der Lipinski-Regeln untersucht. Die Leitstruktur (Betulinsäure) hat einen logP, der über dem vorgegebenen Maximalwert liegt (5,9). Falls ein logP zu hoch ist, kann die Verbindung ihre Löslichkeit im Wasser verlieren. Da BA aber ein Naturstoff ist, dem bereits eine biologische Aktivität nachgewiesen wurde, ist das in diesem Fall nicht zu befürchten. Die meisten Treffer liefern analoge Ergebnisse, wohingegen das Molekül NP-009993 ein zusätzlich leicht erhöhtes Molekulargewicht aufweist. Die Substanzen B-0442-B-

10 und B-1000-B-09 haben ein abweichendes Grundgerüst und weisen dementsprechend auch hier ein abweichendes Ergebnis auf. Sie erfüllen alle Lipinski-Regeln (Tab. 14).

Name	Wasserstoff Akzeptoren	Wasserstoff Donoren	logP	Molekulargewicht [g/mol]	Anzahl der verletzten Lipinski-Regeln
Betulinsäure	3	2	5,9	456,7	1
Ursolsäure	3	2	5,9	456,7	1
NP-009909	3	1	6,1	470,7	1
PHAR040741	3	2	5,9	456,7	1
BAS 1279930	3	2	5,9	456,7	1
NP-010362	3	1	6,1	470,7	1
BN 10953	4	1	6,2	489,7	1
NP-009993	4	0	6,4	512,7	2
B-0442-B-10	4	2	2,9	334,5	0
B-1000-B-09	3	1	3,1	276,4	0

Tabelle 14: Auswertung der Betulinsäure und der Analoga bezüglich der Lipinski-Regeln.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wurden keine Treffer ausgeschlossen und daher alle gefundenen Strukturen in den nachfolgenden Analysen weiter berücksichtigt.

4.2.2.1 Vergleich der Betulinsäure-Analoga mit NCI-Substanzen

In einem zweiten Schritt wurde ein weiteres Bewertungskriterium für die Treffer des *in silico* Screenings eingeführt. Dafür wurden die Daten des NCI-Projektes verwendet. An 60 verschiedenen Tumorzelllinien wurden dort Zytotoxizitätswerte (GI₅₀-Wert, gibt die Konzentration einer Substanz an, die eine 50 %ige Wachstumsinhibition von Zellen bewirkt) für ~ 40 000 niedermolekulare Substanzen bestimmt. Betulinsäure und

die ermittelten Analoga wurden mit diesen Molekülen bezüglich der 2D-Ähnlichkeit verglichen. Die ähnlichsten Substanzen aus der NCI-Datenbank zu den Treffern des *in silico* Screenings sind in Tabelle 15 aufgeführt. Eine ähnliche biologische Aktivität von Betulinsäure bzw. Analoga und deren korrespondierenden NCI-Substanzen scheint wahrscheinlich, da der berechnete TK hoch ist und zwischen 0,88 und 1,0 variiert.

Name	NCI-Struktur [NSC Nummer]	2D-Ähnlichkeit [TK]	GI ₅₀ [µM]
Betulinsäure	113090	1,0	5,19
Ursolsäure	167406	1,0	4,61
NP-009909	167406	0,97	4,61
PHAR040741	167406	0,98	4,61
BAS 1279930	660308	0,99	19,85
NP-010362	167406	0,95	4,61
BN 10953	628661	0,92	85,91
NP-009993	167406	0,90	4,61
B-0442-B-10	35347	0,88	30,42
B-1000-B-09	25149	0,93	55,00

Tabelle 15: Treffer des *in silico* Screenings und die ähnlichsten Substanzen aus dem NCI-Projekt.

Ausserdem sind die korrespondierenden Tanimoto-Koeffizienten (TK) und die GI₅₀ (Konstante für die Hemmung des Zellwachstums)-Werte für die NCI-Substanzen angegeben.

Für jede aufgeführte NCI-Substanz ist ein Profil vorhanden, welches die inhibitorische Wirkung auf die verschiedenen Tumorzelllinien zeigt. In Abbildung 38 (S. 79) ist ein repräsentativer Ausschnitt dieses Profils aufgeführt. Anhand eines Farbcodes kann die Wirksamkeit des Moleküls abgelesen werden. Je niedriger der GI₅₀-Wert ist, desto aktiver ist das Molekül. Ein grüner Balken weist auf einen GI₅₀-Wert zwischen 0 und 10 µM hin. Die restlichen Farben sind wie folgt unterteilt: gelb: 10-20 µM, orange: 20-30 µM, rot: 30-60 µM, dunkelrot: 60-100 µM. Danach sind die Substanzen 113090 (BA) und 167406 (Ursolsäure) sehr wirksam, wohingegen die NCI-Substanzen mit den Nummern 660308, 628661, 35347 und 25149 weniger bis gar nicht aktiv sind.

Der mittlere GI_{50} -Wert ist in der Tabelle 15 aufgeführt. Die Treffer des *in silico* Screenings, dessen korrespondierende NCI-Substanzen einen hohen GI_{50} -Wert aufweisen, sind angesichts der ähnlichen biologischen Aktivität höchstwahrscheinlich auch inaktiv. Dieses trifft auf die Substanzen BAS 1279930, BN 10953, B-0442-B-10 und B-1000-B-09 zu, da die ähnlichsten NCI-Moleküle einen mittleren GI_{50} -Wert von 19.85, 85.91, 30.42 und 55.00 μM aufweisen. Da dieses Bewertungskriterium selbst erst einmal angewandt wurde, wurden diese Substanzen als Negativkontrolle und zur Validierung bei den folgenden *in vitro* Screenings mitgeführt.

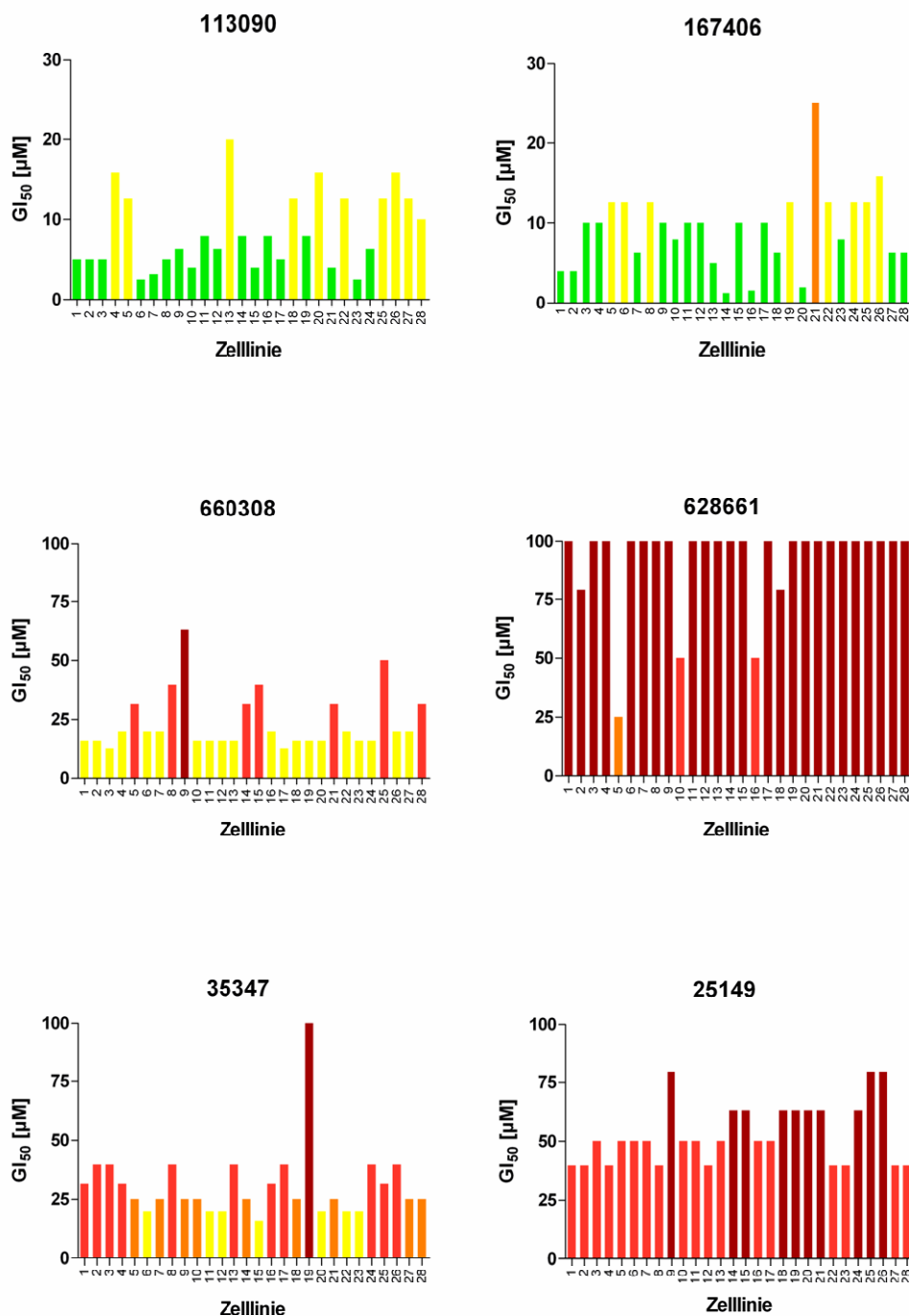


Abbildung 38: GI_{50} -Werte [μM] der NCI-Substanzen (NSC Nummer).

Die Balken sind bezüglich der GI_{50} -Werte [μM] eingefärbt: grün: 0-10, gelb: 10-20, orange: 20-30, rot: 30-60, dunkelrot: 60-100.

Die folgenden Zelllinien sind auf der x-Achse aufgetragen: 1: CCRF-CEM, 2: MOLT-4, 3: A549/ATCC, 4: EKVX, 5: NCI-H226, 6: NCI-H23, 7: NCI-H522, 8: COLO 205, 9: HCC-2998, 10: HCT-116, 11: HT29, 12: KM12, 13: SW-620, 14: SF-268, 15: SF-539, 16: SNB-75, 17: U251, 18: LOX IMVI, 19: MALME-3M, 20: SK-MEL-28, 21: SK-MEL-5, 22: UACC-62, 23:

OVCAR-3, 24: OVCAR-4, 25: OVCAR-5, 26: SK-OV-3, 27: CAKI-1, 28: UO-31 (Daten des DTP (Developmental Therapeutics Program) vom NCI. Stand: Oktober 2006).

4.2.2.2 In vitro Screening mit den Betulinsäure-Analoga

Zur Validierung der Ergebnisse der computerbasierten Suche wurden zwei Apoptose-Experimente durchgeführt, mit denen frühe und späte Zeitpunkte der Apoptose gemessen werden können.

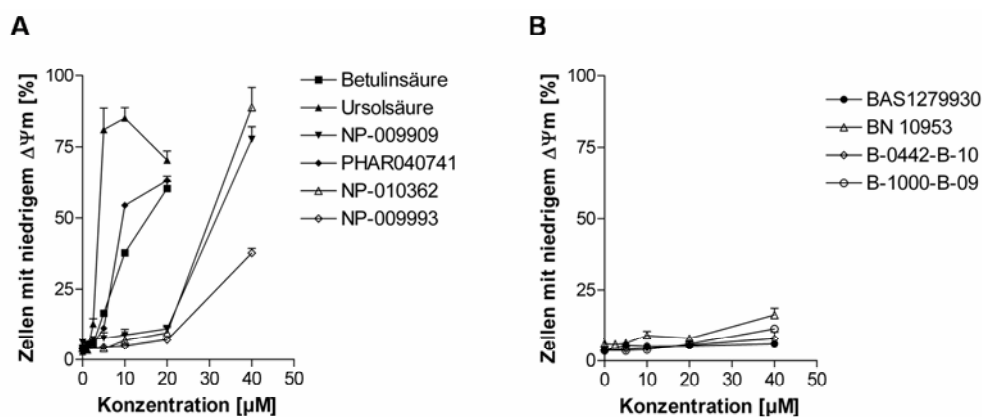


Abbildung 39: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) durch Betulinsäure und deren Analoga in Jurkat A3 Zellen.

A und B Die Zellen wurden mit Betulinsäure oder deren Analoga (Ursolsäure, NP-009909, PHAR040741, NP-010362, NP-009993, BAS1279930, BN 10953, B-0442-B-10, B-1000-B-09) in den angegebenen Konzentrationen für 48 h inkubiert. Die Daten sind in Prozent an Zellen, die ein erniedrigtes mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) aufweisen, angegeben. Diese Zellen befinden sich in der frühen Phase der Apoptose. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Beim ersten Experiment wurde der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials in Jurkat A3 Zellen gemessen. Die Zellen wurden 48 h mit BA und deren Analoga inkubiert und anschließend mittels Durchflußzytometrie auf Einzelzellniveau gemessen. Betulinsäure, Ursolsäure und PHAR040741 zeigten den stärksten Effekt auf das mitochondriale Membranpotential. Bereits bei Zugabe von 20 μM der entsprechenden Substanz wurde der Anteil der Zellen, deren mitochondriales Membranpotential erniedrigt war, auf > 60 % erhöht (Abb. 39 A). Bei einer Konzentration von 40 μM wurde bei den Substanzen NP-009909, NP-010362 und NP-009993 eine signifikante Erhöhung der Zellen, die sich im frühen Stadium der Apoptose befanden,

gemessen (Abb. 39 A), wohingegen die Substanzen BAS1279930, BN10953, B-0442-B-10 und B-1000-B-09, auch bei einer Konzentration von 40 μM , keinen Effekt zeigten (Abb. 39 B).

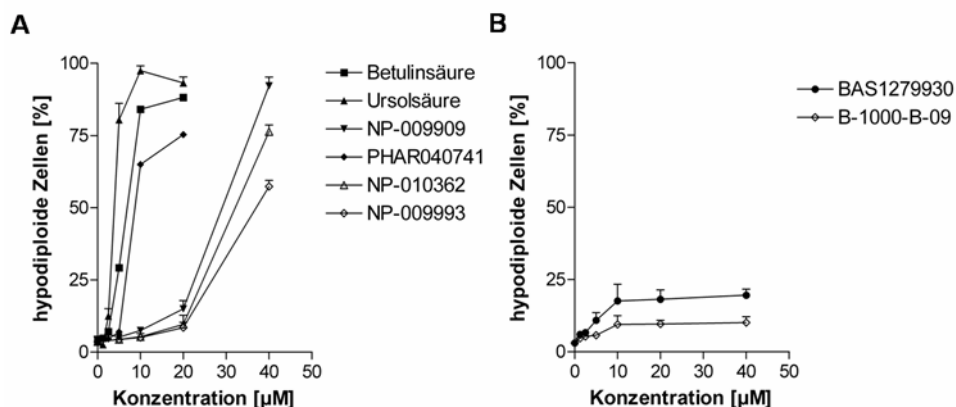


Abbildung 40: Messung der Fragmentierung von genomischer DNA mittels Durchflußzytometrie durch Betulinsäure und deren Analoga.

Jurkat A3 Zellen wurden 72 h in den angegebenen Konzentrationen mit den Zytostatika inkubiert. Die Ergebnisse sind in Prozent an hypodiploiden Zellen angegeben, die die Anzahl der apoptotischen Zellen angeben. Analoga: Ursolsäure, NP-009909, PHAR040741, NP-010362, NP-009993, BAS1279930, B-1000-B-09. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Analog zu den Ergebnissen des Experiments zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials zeigten die Substanzen Betulinsäure, Ursolsäure, NP-009909, PHAR040741, NP-010362 und NP-009993, bei einer Zugabe von 20 oder 40 μM (> 60 %), einen signifikanten Anstieg in der Anzahl an hypodiploiden (apoptotischen) Zellen (Abb. 40 A). Da die Substanzen BAS1279930, B-1000-B-09, BN 10953 und B-0442-B-10 keine Wirkung auf das mitochondriale Membranpotential zeigten, wurde die Messung der Fragmentierung von genomischer DNA nur noch mit BAS1279930 und B-1000-B-09 durchgeführt. Bei einer Zugabe von 40 μM dieser Substanzen zeigte sich lediglich eine Apoptoserate von ~ 15 % (Abb. 40 B).

Die experimentelle Validierung zeigt, dass fünf von neun gefundenen Betulinsäure-Analoga signifikant Apoptose in Jurkat A3 Zellen auslösen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Analoga, die durch den Vergleich mit den NCI-Substanzen als möglicherweise inaktiv identifiziert wurden, auch keinen Effekt in den Jurkat A3 Zellen zeigten.

4.3 BCL-2-INHIBITOREN UND PHOTOSCHALTER

4.3.1 *In silico* Screening mit BH3I-1 und BH3I-2 als Leitstrukturen

Im dritten Modellprojekt wurden *in silico* Screenings mit den aus der Literatur bekannten Bcl-2-Inhibitoren BH3I-1 und BH3I-2 [101] als Leitstrukturen in der Inhouse-Datenbank durchgeführt, um neue, effektivere niedermolekulare Substanzen zu identifizieren. In Abbildung 41 sind die Leitstrukturen und die dazugehörigen Konformere dargestellt. Beide Leitstrukturen weisen eine hohe Anzahl an Wasserstoffakzeptoren auf, die auf eine hohe Reaktivität des Moleküls schließen lassen.

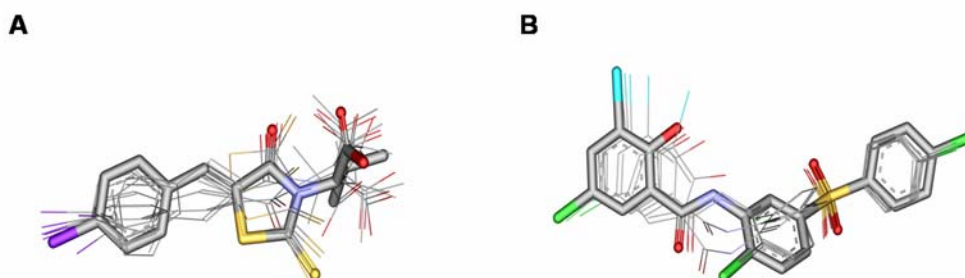


Abbildung 41: 3D-Strukturen der Bcl-2-Inhibitoren und die dazugehörigen Konformere. Die bereits bekannten Bcl-2-Inhibitoren **A** BH3I-1 und **B** BH3I-2 wurden als Leitstrukturen für eine *in silico* Screening verwendet. Die Atome sind folgendermaßen gefärbt: grau: Kohlenstoff, lila: Brom, gelb: Schwefel, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, grün: Chlor, hellblau: Jod.

Die Ergebnisse des *in silico* Screenings und das Eigenschaftsprofil, bezogen auf die Lipinski-Regeln, sind in Tabelle 16 dargestellt. Alle Treffer weisen einen TK oberhalb des Grenzwertes von 0,85 auf. Da der TK für das Molekül 1S-55243 mit einem Wert von 0,86 (Tab. 16) sehr niedrig ist, wurde dieses Molekül vorerst nicht weiter untersucht. Weiterhin wurden die Moleküle A0746-0034828 und A2862-0120683 von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da die Auswertung bezüglich der Lipinski-Regeln ergeben hat, dass die Anzahl der Wasserstoffdonoren über dem vorgegebenen Grenzwert liegt (Lipinski-Regeln: Anzahl der Wasserstoffdonoren < 5; A0746-0034828: 6, A2862-0120683: 7) (Tab. 16).

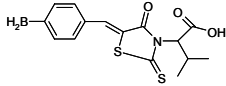
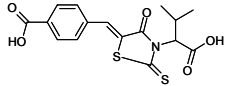
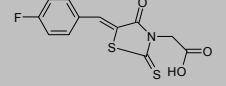
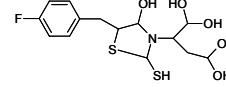
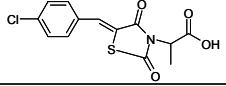
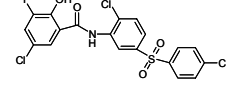
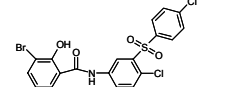
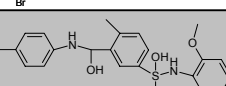
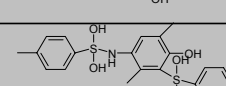
Name	2D-Struktur	TK	Molekulargewicht [g/mol]	logP	Wasserstoff- akzeptoren	Wasserstoff- donoren
BH3I-1		1	398,96	4,75	6	2
BAS 536121		0,94	365,04	1,57	6	2
1S-55234		0,86	297,33	1,48	4	1
3S-91283		0,91	371,49	2,09	6	5
3S-12317		0,90	311,74	1,50	5	1
BH3I-2		1	580,85	4,75	5	2
BAS 0289097		0,98	580,09	4,75	5	2
A0746-0034828		0,92	433,68	3,44	6	6
A2862-0120683		0,91	454,71	3,22	6	7

Tabelle 16: Ergebnisse des in silico Screenings mit BH3I-1 und BH3I-2 als Leitstrukturen.

Die Moleküle sind als 2D-Struktur dargestellt, zusammen mit dem Tanimoto-Koeffizienten (TK) und der Auswertung bezüglich der Lipinski-Regeln (Molekulargewicht, logP, Wasserstoffakzeptoren, Wasserstoffdonoren). Die Moleküle, die grau unterlegt sind, werden in den nachfolgenden Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt.

Um eine Aussage über die Bindungsaffinität der vier verbliebenen Substanzen zu machen, wurden Docking-Experimente durchgeführt.

4.3.2 Docking der Treffer aus dem *in silico* Screening

Von jeder Substanz wurden 50 verschiedene Konformere an die Bindungsseite des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L gedockt. Als Referenzligand wurde die BH3-Helix des pro-apoptotischen Proteins Bak verwendet (PDB-code: 1BXL). Die Docking-Ergebnisse in Tabelle 17 zeigen, dass die Substanzen BAS 0536121 und BAS 0289097 einen höheren (besseren) *GOLDScore* besitzen als die dazugehörigen Leitstrukturen, was auf eine bessere Bindungsaffinität zum Targetprotein schließen lässt, wohingegen die *GOLDScores* für 3S-91283 und 3S-12317 einen sehr viel schlechteren *GOLDScore* aufweisen. Weiterhin wurde die Bindungsenergie ($\Delta G_{\text{binding}}$) für jede Substanz berechnet und die Ergebnisse stimmen mit denen des *GOLDScores* überein. BAS 0536121 und BAS 0289097 haben eine ähnliche, vorhergesagte $\Delta G_{\text{binding}}$ wie die Leitstrukturen (BH3I-1: -25,59 kJ/mol, BAS0536121: -23,49 kJ/mol, BH3I-2: -38,83, BAS 0289097: -35,11 kJ/mol) (Tab. 17). Die Bindungsenergien von 3S-91283 und 3S-12317 sind, im Vergleich mit den Leitstrukturen, schlechter (3S-91283: -13,52 kJ/mol, 3S-12317: -19,81 kJ/mol) (Tab. 17).

Name	<i>GOLDScore</i>	$\Delta G_{\text{binding}}$ [kJ/mol]
BH3I-1	50,47	-25,59
BAS 0536121	52,49	-23,49
3S-91283	-122,04	-13,52
3S-12317	-53,88	-19,81
BH3I-2	51,33	-38,83
BAS 0289097	53,31	-35,11

Tabelle 17: *GOLDScore* und $\Delta G_{\text{binding}}$ für BH3I-1, BH3I-2 und Analoga.

Die Berechnung wurde mit dem Docking-Programm GOLD durchgeführt. Die Moleküle, die grau unterlegt sind, werden in den nachfolgenden Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt

In den Abbildungen 42 und 43 sind die Ergebnisse des Dockings der Bcl-2-Inhibitoren und deren Analoga an die Bindungsseite von Bcl-x_L graphisch dargestellt. Die Bindung des Referenzliganden an die hydrophobe Grube von Bcl-x_L, die von den

Domänen BH1, BH2 und BH3 gebildet wird, wurde in der Literatur mittels NMR Untersuchungen nachgewiesen [101, 152] (Abb. 42 E).

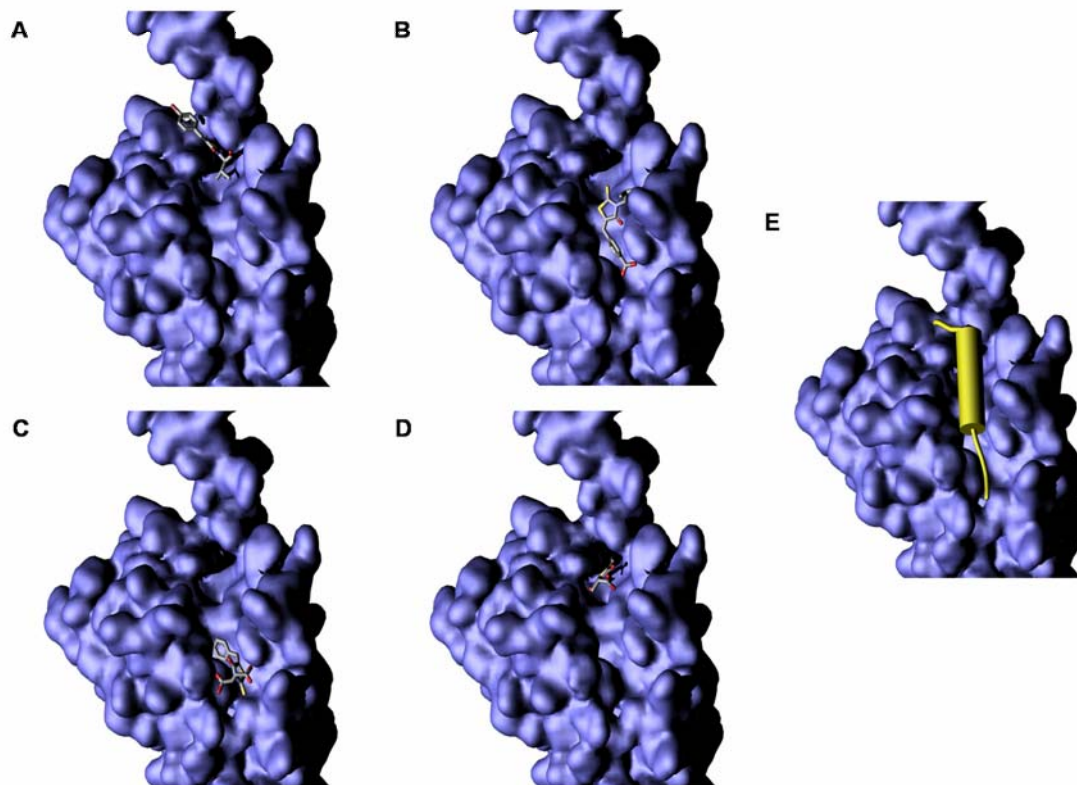


Abbildung 42: Docking-Ergebnisse von BH3I-1 und Analoga.

Die Moleküle **A** BH3I-1 **B** BAS 0536121 **C** 3S-91283 und **D** 3S-12317 wurden an das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L gedockt (PDB-code: 1BXL). Als Referenzligand diente die BH3 Helix von Bak (**E**). Für das Docking wurde das Programm GOLD verwendet.

BH3I-1 bindet im oberen Teil der Bindungstasche (Abb. 42 A), wohingegen das Analogon BAS 0536121 im unteren Teil (Abb. 42 B) bindet, welcher ebenfalls durch die Leitstruktur BH3I-2 und dessen Analogon BAS 0289097 (Abb. 43) abgedeckt wird. Die Abbildungen 42 C und D zeigen die Bindung von 3S-91283 und 3S-12317, die jeweils nur an einen kleinen Bereich des unteren oder des oberen Teils der Bindungsseite binden.

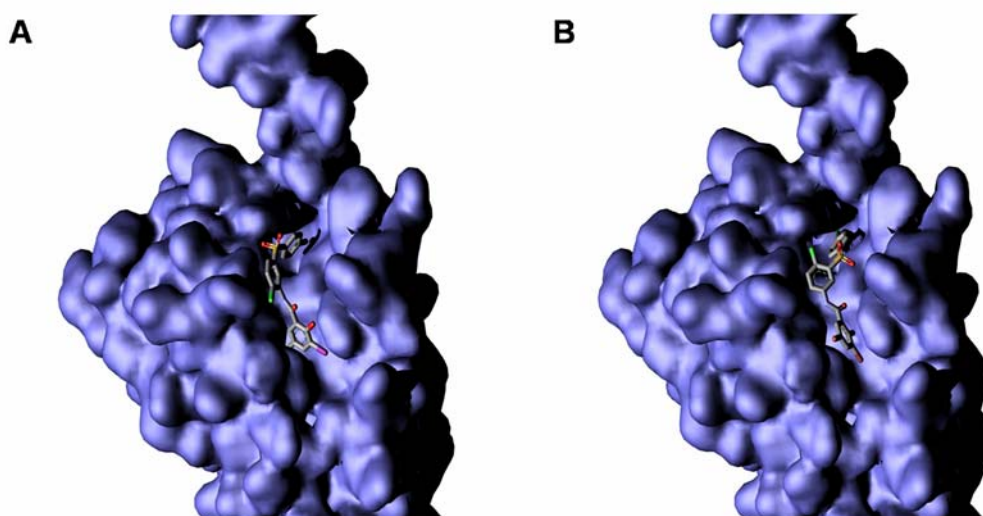


Abbildung 43: Docking-Ergebnisse von BH3I-2 und Analogon.

Die Moleküle **A** BH3I-2 und **B** BAS 0289097 wurden an das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L gedockt (PDB-code: 1BXL). Als Referenzligand diente die BH3 Helix von Bak. Für das Docking wurde das Programm GOLD verwendet.

Folglich wurden die Moleküle 3S-91283 und 3S-12317 bei den experimentellen Versuchen nicht weiter untersucht. BH3I-1 und dessen Analogon BAS 0536121, sowie BH3I-2 und dessen Analogon BAS 0289097, werden derzeit *in vitro* (durchgeführt von N. Gebhardt) getestet (Abb. 44). Erste Ergebnisse haben gezeigt, dass die Analoga BAS0536121 und BAS0289097 wirksam Apoptose in verschiedenen Zelllinien auslösen (Daten nicht gezeigt, durchgeführt von N. Gebhardt).

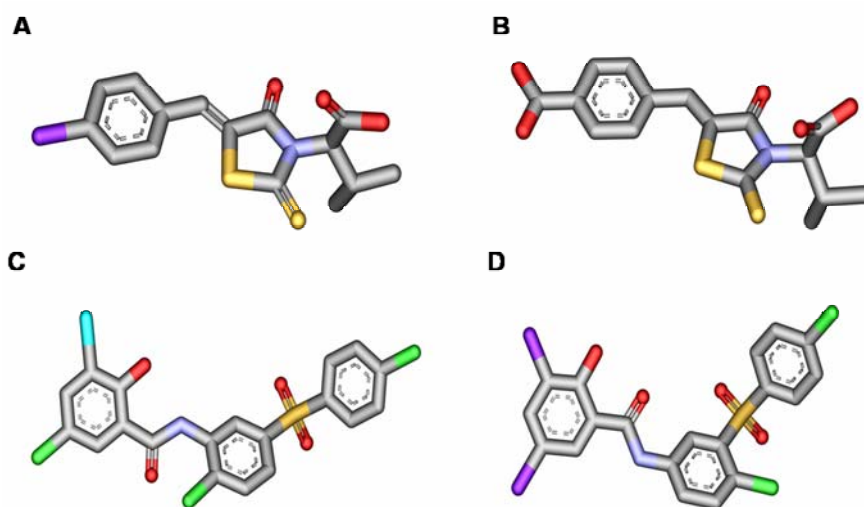


Abbildung 44: 3D-Strukturen der Bcl-2-Inhibitoren und deren Analoga.

A BH3I-1 **B** BAS 0536121 **C** BH3I-2 **D** BAS 0289097. Die Atome sind folgendermaßen gefärbt: grau: Kohlenstoff, lila: Brom, gelb: Schwefel, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, grün: Chlor, hellblau: Jod.

4.3.3 Gezielte Apoptoseinduktion durch Photoschalter

4.3.3.1 Erstellung des Modells

Niedermolekulare Substanzen, die eine lichtinduzierte Konformationsänderung aufweisen, können direkt als Inhibitoren für Proteine verwendet werden [109] oder an die Aminosäuren-Seitenketten eines Peptides binden und somit als Modulator dienen, was in diesem Projekt durchgeführt werden sollte. Dafür wurde an die α -helikale BH3-Domäne des pro-apoptotischen Proteins Bid, welches für die Bindung an die hydrophobe Grube der anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder benötigt wird, der Photoschalter Hemithioindigo synthetisiert. Dieser Photoschalter sollte in der cis-Konformation eine Stabilität der BH3 Helix gegenüber dem proteolytischen Abbau gewährleisten und durch Bestrahlung mit definierter Wellenlänge in die trans-Konformation übergehen, wodurch eine partielle Auflösung der helikalen Struktur und somit auch eine Inaktivierung herbeigeführt werden sollte (Abb. 45). Eine Helix, die die Funktionen des pro-apoptotischen Bid nachahmt und gezielt aktiviert bzw. inaktiviert werden kann, sollte entstehen. Die Originalsequenz wurde an zwei Positionen (Q94DAP, S98D; Q: Glutamin, DAP: Diaminopropionsäure, S: Serin, D: Asparaginsäure), die für den Einbau von Hemithioindigo notwendig waren, verändert. Damit die

Bindungseigenschaften der BH3-Domäne nicht beeinträchtigt werden, wurden die Aminosäuren an der Stelle 94 und 98 ausgewählt, da sie sich auf der Seite der Helix befinden, die der Bindungsregion gegenüber liegt. Außerdem haben diese Aminosäuren die räumliche Entfernung zueinander, die für den Einbau von Hemithioindigo benötigt wurde. Es wurde ein Modell gebaut, bei dem eine Peptidbindung zwischen der Carboxylgruppe und der Aminogruppe von Hemithioindigo und DAP oder Asparaginsäure und Hemithioindigo hergestellt wurde (Modell von E. Michalsky).

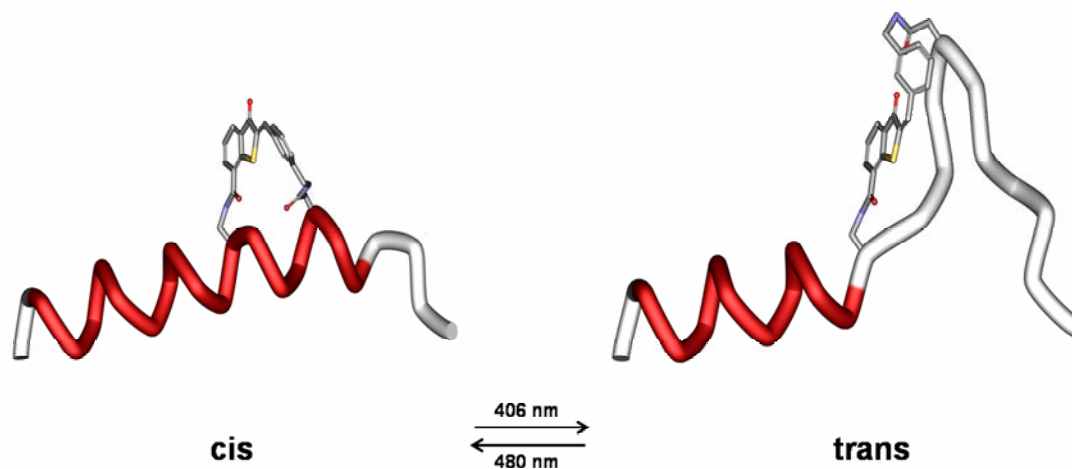


Abbildung 45: Modell des α -helikalen BH3-Peptides aus dem pro-apoptotischen Protein Bid mit eingebautem Photoschalter (Hemithioindigo).

Die Struktur der Helix wird bei cis-Konformation des Photoschalters stabilisiert und bei trans-Konformation des Photoschalters instabilisiert. Durch Bestrahlung mit angegebener Wellenlänge können die Konformationen ineinander überführt werden. Die Sequenz wurde bei den folgenden Aminosäure verändert: Q94DAP und S98D. (Modell von E. Michalsky)

4.3.3.2 Experimentelle Untersuchung der schaltbaren BH3-Helix

In einem ersten Versuch sollte untersucht werden, ob der Einbau des Photoschalters eine Stabilisierung der BH3-Helix bewirkt. Das Peptid ohne Hemithioindigo und mit Hemithioindigo wurde in verschiedenen Konzentrationen mit Jurkat A3 Zellen für 20 h inkubiert. Eine Annexin-V-FITC / PI Doppelfärbung wurde durchgeführt, wobei Annexin V an Phosphatidylserin bindet, welches in der frühen Phase der Apoptose von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran transloziert wird. Damit die Bindung sichtbar gemacht werden kann, wird Annexin V mit FITC markiert. Parallel wurden die Zellen mit PI gefärbt. Lebende Zellen weisen keine Färbung auf (FITC⁻

/PI⁻), apoptotische Zellen sind positiv für FITC (FITC⁺/PI⁻) und nekrotische Zellen sind doppelt gefärbt (FITC⁺/PI⁺). Die Ergebnisse in Abbildung 46 zeigen, dass bei einer Konzentration von 50 µM die Anzahl an apoptotischen Zellen ohne den stabilisierenden Photoschalter bei 18,4 % liegt, wohingegen die Anzahl an apoptotischen Zellen durch die stabilisierende Wirkung des Photoschalters auf 45 % ansteigt. Weiterhin ist zu erkennen, dass ein apoptotischer und kein nekrotischer Zelltod ausgelöst wurde [153].

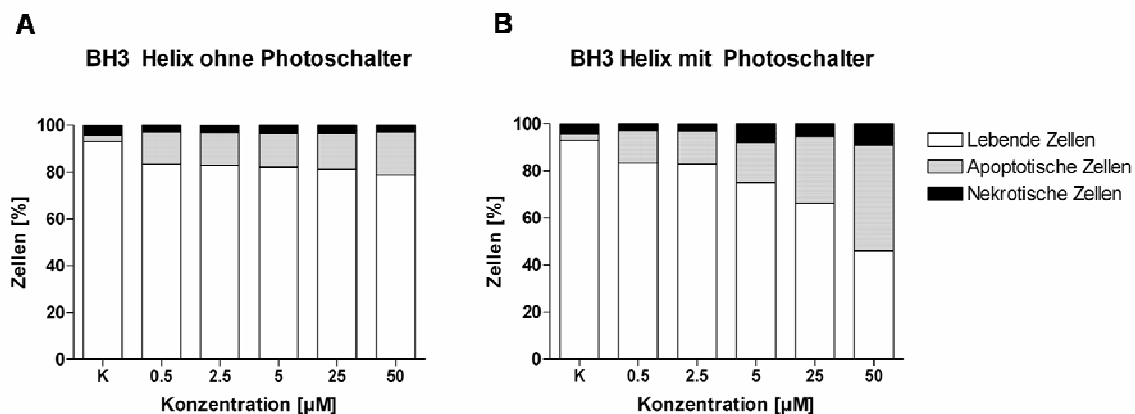


Abbildung 46: Annexin-V-FITC / PI-Doppelfärbung mit der BH3-Helix in Jurkat A3 Zellen.

Die BH3-Helix, die zur Stabilisierung einen eingebauten Photoschalter (ohne Bestrahlung, sowohl cis- als auch trans-Konformation liegen vor) besitzt, und die ursprüngliche Helix ohne Stabilisierung wurden für 20 h in den angegebenen Konzentrationen mit Jurkat A3 Zellen inkubiert. Anschließend wurde der Zelltod auf Einzelzellniveau durch Bindung von Annexin-V-FITC und Gegenfärbung mit Propidiumjodid untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale Verteilung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zelle nach der Behandlung mit dem Peptid.

Um zu zeigen, dass durch Bestrahlung eine gezielte Aktivierung des Peptides ausgelöst werden kann, wurde die schaltbare BH3 Helix entweder mit Licht der Wellenlänge 406 nm (cis → trans, instabil/inaktiv) oder mit Licht der Wellenlänge 480 nm (trans → cis, stabil/aktiv) bestrahlt, wodurch der Photoschalter in die jeweilige Konformation überführt werden kann. Nach Zugabe der geschalteten Helix zu Jurkat Bcl-2 Zellen in den angegebenen Konzentrationen wurden diese für 48 h inkubiert. Jeweils nach 12 h wurden die Zellen erneut bestrahlt, damit die Helix in dem gewünschten Zustand bleibt. Nach der Inkubation wurde die Fragmentierung von genomischer DNA mittels Durchflußzytometrie auf Einzelzellniveau gemessen. In Abbildung 47 ist ein deutli-

cher Unterschied in der Anzahl an hypodiploiden Zellen zwischen der aktivierten und inaktivierten Helix erkennbar. Während die inaktive Helix bei einer Konzentration von 50 μM eine Apoptoserate von 27 % aufweist, liegt die Anzahl der apoptotischen Zellen bei der aktivierten Helix bei 70 %. Die Kontrollzellen (ohne BH3-Helix), die auch mitbestrahlt wurden, damit eine Schädigung der Zellen durch die Bestrahlung ausgeschlossen werden konnte, zeigten eine Apoptoserate von $\sim 3\%$ (Daten nicht gezeigt).

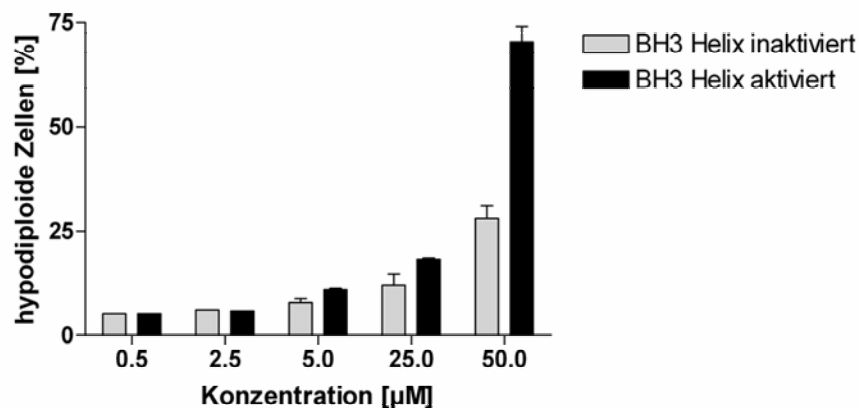


Abbildung 47: DNA-Fragmentierung nach Aktivierung bzw. Inaktivierung der BH3-Helix.

Durch Bestrahlung mit definierten Wellenlängen wurde die BH3-Helix aktiviert bzw. inaktiviert und anschließend in den angegebenen Konzentrationen zu Jurkat Bcl-2 Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 48 h wurde die Fragmentierung von genomischer DNA mittels Durchflußzytometrie auf Einzelzellniveau für die aktivierte bzw. inaktivierte BH3-Helix untersucht. Die Ergebnisse sind in Prozent an hypodiploiden Zellen angegeben, die die Anzahl der apoptotischen Zellen angeben. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. (Durchgeführt in Zusammenarbeit mit J. Hoßbach und I. Jäger)

Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass eine gezielte Apoptoseinduktion durch den Einbau eines Photoschalters an die Aminosäuren-Seitenketten der α -helikalen BH3-Domäne des pro-apoptotischen Proteins Bid funktioniert, was neue Möglichkeiten in der Medikamentenentwicklung gegen Krebs eröffnet, da eine lokale Aktivierung durch Bestrahlung ermöglicht wird. Hierdurch können unspezifische Apoptoseeffekte in normalen, Nicht-Tumorzellen, vermindert werden.

5 DISKUSSION

Derzeit dauert es durchschnittlich 10 – 15 Jahre, um ein neues Medikament in den USA zur Marktreife zu bringen und z.B. die Zulassung durch die US-Arzneimittelbehörde FDA (*Food and Drug Administration*) zu erhalten. Eine aktuelle Studie aus den USA zeigt, dass jedes neue Medikament etwa 1 Mrd € kostet. Von 5 000 getesteten Substanzen kommen nur fünf bis zum Stadium der klinischen Erprobung an Menschen. Am Ende wird von diesen fünf nur eine zugelassen. Im Zeitalter der computerbasierten Medikamentenentwicklung ist es ein großes Ziel, die Zeit und Kosten für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zu verkürzen.

Der Fokus dieser Arbeit wurde auf apoptoseinduzierende Substanzen gelegt, die zur Entwicklung neuer Krebstherapeutika von großer Bedeutung sind. Im Rahmen von drei Modellprojekten wurden computerbasierte Methoden verwendet und entwickelt, deren Vorhersagen durch experimentelle Versuche validiert wurden. Es wurden neue Substanzen gefunden, die Apoptose in Tumorzellen induzieren und damit als neue Leitstrukturen oder mit Hilfe von Optimierungsprozessen in weitere Stufen der Entwicklung eintreten könnten.

5.1 NEUE KINASEINHIBITOREN INDUZIEREN APOPTOSE IN TUMORZELLEN UND HEMMEN DIE ANGIOGENESE

Dass Curcumin und Emodin die Kinaseaktivität der CSN-assoziierten-Kinasen hemmen können und dadurch den Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Abbau von c-Jun induzieren, wurde bereits beschrieben [39, 48]. Außerdem wurde die Stabilisierung des Tumorsuppressores p53 gegenüber dem Ubiquitin-System durch die Zugabe von Curcumin gezeigt [44]. Der daraus resultierende Anstieg der p53-Konzentration führte zu einem massiven Zelltod der Tumorzellen [141, 142]. Daher ist besonders in Tumorzellen, die den Wildtyp von p53 exprimieren, eine Erhöhung des intrazellulären p53-Spiegels von möglicher therapeutischer Bedeutung.

Sowohl die Reduktion von c-Jun, als auch der Anstieg der p53-Konzentration, sind für die Tumorthherapie ein wichtiger Aspekt und können durch die Inhibition der CSN-assoziierten-Kinasen CK2 und PKD erreicht werden. Durch eine computerbasierte

Datenbanksuche sollten neue effektive Inhibitoren für diese Kinasen gefunden werden. Als Leitstrukturen wurden Curcumin und Emodin verwendet, die mit etwa vier Millionen Strukturen aus einer Kleinstrukturdatenbank, bezüglich ihrer chemischen und strukturellen Eigenschaften, verglichen wurden. Im Gegensatz zu Hochdurchsatzmethoden (HTS, *High-throughput Screening*) ermöglicht das *in silico* Screening den Ausschluss einer großen Anzahl von Molekülen, bevor sie experimentell getestet werden. Solche HTS Methoden werden oft angewendet und entsprechende Systeme können bis zu 125 000 Strukturen am Tag testen, wobei diese Experimente nicht sehr unproblematisch sind [154, 155]. Der Zeit- und Kostenaufwand für diese Versuche ist immens und es ist sehr schwierig, falsch-positive Treffer aus der großen Datenmenge herauszufiltern [154]. Bei der hier durchgeführten virtuellen Suche wurden 35 Moleküle identifiziert, die als vielversprechende Kandidaten für die Inhibition der CSN-assoziierten-Kinasen eingestuft wurden. Zusätzlich wurden die Treffer im Bezug auf die Lipinski-Regeln und toxikologischer Merkmale untersucht, wobei dadurch keine Treffer ausgeschlossen wurden. Von diesen 35 Treffern hatten 7 einen inhibitorischen Effekt auf die rekombinanten Enzyme CK2 und PKD, sowie auf die Kinaseaktivität des CSN-Komplexes. Demnach lag die Trefferquote für das *in silico* Screening bei 20 %, wohingegen die Trefferquote für Hochdurchsatzmethoden durchschnittlich bei 2 % liegt [156].

Aufgrund der unterschiedlichen Grundgerüste der Leitstrukturen konnten die Treffer in zwei Gruppen unterteilt werden. Somit ergaben sich drei Treffer aus der Suche mit Curcumin und vier Treffer aus der Suche mit Emodin, die sowohl in Versuchen mit den rekombinanten Proteinen, als auch in Zellexperimenten biologisch aktiv waren. Die strukturellen Unterschiede führten auch zu den unterschiedlichen Affinitäten im Bezug auf die Inhibition der beiden Kinasen. Während die Curcumin-ähnlichen Substanzen einen wesentlich niedrigeren IC_{50} -Wert für die Hemmung der PKD aufwiesen, waren die Emodin-ähnlichen Substanzen bessere Inhibitoren für die CK2. Aus der Literatur ist Emodin als kompetitiver CK2 Inhibitor, der an die ATP-Bindungsstelle des Enzyms bindet, bekannt (PDB-Code: 1F0Q) [157, 158]. Docking-Simulationen haben ergeben, dass die Gruppe der Curcumin-ähnlichen ebenfalls an diese Stelle binden kann und identische Bindungsenergien wie Emodin aufweisen. Da auch die Effekte von Curcumin, wie man es bei einem kompetitiven Inhibitor erwarten würde,

reversibel sind [48], kann man abschließend vermuten, dass die gefundenen Treffer ebenfalls mit ATP um die ATP-Bindungsstelle konkurrieren. Obwohl die ATP-Bindungsstelle bei Kinasen hoch konserviert ist [159], variiert sie doch so stark, dass strukturelle Unterschiede bei den Inhibitoren auch eine unterschiedliche Affinität für die CSN-assoziierten-Kinasen hervorrufen. Da jedoch alle Inhibitoren die Kinaseaktivität von PKD und CK2 hemmen können und bei Docking-Untersuchungen auch für alle Inhibitoren ähnliche Bindungsenergien wie für Emodin berechnet wurden, kann man bei der Hemmung des CSN-Komplexes von einem additiven Effekt ausgehen. Dieses wird auch durch die IC_{50} -Werte gestützt, die bei der Hemmung des CSN-Komplexes in den meisten Fällen niedriger waren als bei den rekombinanten Proteinen. In den durchgeführten Zellversuchen wurde gezeigt, dass durch die Zugabe der Inhibitoren eine Reduktion der c-Jun- und eine Erhöhung der p53-Konzentration auftrat, was einen massiven Zelltod und eine stark verminderte Vitalität der Zellen zur Folge hatte.

Anhand der erhobenen Daten kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die getesteten Substanzen ihre pro-apoptotische Wirkung unabhängig vom CSN und p53 entfalten. Curcumin inhibiert beispielsweise die NF- κ B Aktivierung, wodurch ebenfalls Apoptose ausgelöst wird [160]. Zudem ist die genaue Funktion von c-Jun bei der Auslösung von Apoptose nicht geklärt, aber niedrige Konzentrationen von c-Jun, wie sie in den durchgeführten Versuchen gemessen wurden, könnten ebenfalls zur Auslösung des Apoptose Programms beitragen (vgl. mit [45]). In jedem Fall stimuliert die Zugabe der Substanzen den apoptotischen Zelltod in Tumorzellen, was dem Einsatz in der Tumorthherapie sehr zuträglich ist. Aufgrund seiner effektiven Wirkung in Tumorzellen ist Curcumin bereits in Phase I der klinischen Studien und die Daten befürworten einen baldigen Start der Phase II [161]. Tierversuchsstudien, für den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Treffer BTB14431, sind bereits bewilligt und lassen auf einen ähnlichen Erfolg hoffen [162].

5.2 BETULINSÄURE LÖST APOPTOSE UNABHÄNGIG VON DEN PROTEINEN DER BCL-2-FAMILIE AUS

Betulinsäure (BA) ist eine pentazyklische Triterpen-Carbonsäure, die als Phytoalexin hauptsächlich in der Rinde vieler verschiedener Pflanzen vorkommt. Seit langem ist BA als potentiell Krebsmedikament, das Apoptose über den mitochondrialen Signalweg auslöst, bekannt. Der Wirkmechanismus ist jedoch weitestgehend ungeklärt. Viele Krebstherapeutika wirken auf diesen intrinsischen Apoptoseweg über die Regulation der BH3-only Proteine, die lediglich die Bcl-2 Homologie-Domäne 3 enthalten [68]. Durch Hochregulation oder posttranslationale Modifikation der BH3-only Proteine werden die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak aktiviert, was zu einer Konformationsänderung und einer Oligomerisierung in der äußeren Mitochondrienmembran führt. Dadurch kommt es zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, wie z.B. Cytochrom c aus dem Intermembranraum. Dieses führt zur Bildung des Apoptosom Komplexes mit APAF-1 und Procaspase-9, die dadurch aktiviert und prozessiert wird, und dadurch die Caspase-Kaskade aktiviert [163]. Smac/Diablo, als zweiter mitochondrialer Aktivator von Caspasen, interagiert mit den Inhibitor von Apoptose Proteinen (IAPs) und verhindert deren Bindung an aktivierte Caspasen. Weiterhin kann Smac den Ubiquitin Ligase Aktivitäten von IAPs entgegenwirken, was ebenfalls zur Apoptose auslösenden Fähigkeit von Smac beitragen kann [164]. Die Aktivierung der Mitochondrien wird durch anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder gehemmt, welche die BH3-only Proteine und die Bcl-2-Homologen pro-apoptotischen Bax und Bak binden und inaktivieren können [68, 73, 149, 165].

In diesem Projektteil wurde untersucht, ob BA den mitochondrialen Apoptoseweg über eine regulierte Cytochrom c Freisetzung und Caspase-Aktivierung induziert, die durch Bcl-2 inhibierbar ist und eine Bax/Bak-aktivierte Permeabilisierung der mitochondrialen Membran aufweist. Es wurde die Hemmung des BA-induzierten Zelltods durch Bcl-2 oder Bcl-x_L in drei unabhängigen Zellsystemen untersucht. Bei einer Konzentration von 10 % BA wurde der BA-induzierte Zelltod in Jurkat Zellen durch Bcl-2 gehemmt. Der Effekt von Bcl-x_L war in BJAB Zellen analog, wohingegen in Jurkat Zellen keine Inhibition durch Bcl-x_L festgestellt werden konnte. Jedoch war der

Hauptteil des BA-induzierten Zelltodes weder durch Bcl-2, noch durch Bcl-x_L hemmbar.

In drei adhärenenten Zelllinien (DU145 Prostatakarzinom, HCT116 Kolonkarzinom und murine embryonale Fibroblasten (MEF)) wurde die Abhängigkeit von Bax und Bak, bezogen auf den Zelltod, der durch BA ausgelöst wird, untersucht. Die Abwesenheit von Bax in DU145 Zellen hatte keinen Einfluss auf die DNA-Fragmentierung und die Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials. Im Gegensatz dazu wurde in HCT116 Zellen festgestellt, dass durch den Verlust von Bax eine leichte Desensibilisierung der Zellen gegenüber BA stattgefunden hat. Um auszuschließen, dass Bak den BA-induzierten Zelltod vermittelt, wurde die Funktion von Bak in Bax positiven oder negativen HCT116 Zellen, die eine shRNA gegen Bak exprimieren, untersucht. Dadurch, dass die Expression von Bak runterreguliert wurde, wurde ein Effekt, der dem bei Verlust von Bax ähnlich war, festgestellt. Dennoch war auch hier zu erkennen, dass die Mehrheit des BA-induzierten Zelltods unabhängig von Bax und Bak war.

Somit zeigte sowohl die Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-x_L, als auch der Verlust von Bax und Bak, einen geringen Effekt auf den BA-induzierten Zelltod. Der durch BA ausgelöste Zelltod scheint demzufolge weitestgehend unabhängig von der Bcl-2-Proteinfamilie zu sein. Ob BA den Zelltod über die Aktivierung eines regulierten Signalwegs auslöst oder einfach toxisch wirkt, musste nun weiter untersucht werden.

Untersuchungen bezüglich der Annexin V-Bindung, der Fragmentierung von genomischer DNA und der Zellmorphologie, deuteten auf eine Aktivierung von Caspasen hin. Da durch die Hemmung der Pan-Caspasen mit zVAD-fmk fast der gesamte BA-induzierte Zelltod inhibiert wurde, konnte die Auslösung eines apoptotischen und nicht nekrotischen Zelltods durch BA bestätigt werden.

Frühere Untersuchungen in FADD/Caspase-8-defizienten Jurkat Zellen haben gezeigt, dass BA einen Todesrezeptor unabhängigen Zelltod auslöst [97]. In MEF Zellen wurde im vorliegenden Projekt bei Verlust von Caspase-9 eine Minderung der BA-induzierten Apoptoserate festgestellt, was zur Annahme führt, dass das Apoptosom eine Rolle im BA-induzierten Zelltod spielt. Der Verlust von APAF-1 in MEF Zellen zeigte jedoch nur teilweise eine Minderung in der durch BA hervorgerufenen Apopto-

serate. Daher scheint nur ein Teil der BA-induzierten Caspase-Aktivierung durch das Apoptosom vermittelt zu werden.

Eine Bax/Bak-unabhängige Aktivierung von den Caspasen-9/-3 könnte durch eine BA-induzierte Freisetzung von Smac hervorgerufen werden. Eine ähnliche Bax/Bak/Bcl-x_L unabhängig ausgelöste Apoptose wurde bei einer ektopischen Expression von Smac beobachtet [166]. Durch eine adenovirale Expression von Smac in HCT116 und DU145 Zellen wird Apoptose in Bax-defizienten DU145 und HCT116 Zellen unabhängig von einer Bcl-x_L Überexpression ausgelöst. Desweiteren ist der Smac-induzierte Zelltod abhängig von der Anwesenheit von Caspase-3, was analog zu der essentiellen Anwesenheit von Caspase-9 im vorliegenden Projekt ist. Die direkte Aktivierung des post-mitochondrialen Zelltod Signalweges kann auch erklären, warum BA, im Gegensatz zu ionisierender Strahlung oder DNA-schädigenden Krebsmedikamenten, die durch die Aktivierung von Bax wirken [167, 168, 169, 170], nur einen additiven Effekt zeigt, wenn es mit dem Todesliganden TRAIL kombiniert wird [171]. Die mitochondrial ausgelöste Caspase-Aktivierung kann zu einer Amplifikationsschleife führen, die wiederum eine Aktivierung von Bid durch Caspase-3 auslöst, was zu einer zweiten Aktivierung von Bax und Bak führt und durch Bcl-2 inhibiert werden kann [148, 172]. Dadurch könnte auch die partielle Inhibition der BA-induzierten Apoptose durch Bcl-2 und Bcl-x_L in Jurkat und BJAB Zellen und die partielle Abhängigkeit von Bax und Bak in HCT116 Zellen erklärt werden.

Die Tatsache, dass BA Apoptose in einer weitestgehend Bax/Bak unabhängigen Art und Weise auslöst, ist positiv zu bewerten, da in humanen Krebszellen häufig kein Bax vorkommt und Bak durch anti-apoptotische Proteine wie Bcl-x_L, Mcl-1 [165] und nicht der Bcl-2-Familie zugehörigen Proteine wie VDAC2 [173] inhibiert ist. Jedoch muss in weiteren Untersuchungen getestet werden, ob ein nicht regulierter Eingriff einer niedermolekularen Struktur in den mitochondrialen Signalweg für den Einsatz als Krebstherapeutikum in Betracht kommt. Besonders die unspezifische Aktivierung solcher Vorgänge in nicht malignen Zellen, wie z.B. den hier untersuchten MEF Zellen, muss untersucht werden.

5.3 IDENTIFIZIERUNG NEUER BETULINSÄURE-ANALOGA DURCH DEN VERGLEICH MIT BEKANNTEN GI₅₀ PROFILEN

In einem weiteren Schritt sollten für den Naturstoff Betulinsäure (BA), mittels computerbasierter Methoden, neue Analoga gefunden und experimentell validiert werden. BA löst in einer Vielzahl von Tumorzelllinien Zelltod aus und ein zytotoxischer Effekt ist für verschiedene Erkrankungen bereits beschrieben worden [174, 175, 176, 177], wodurch es zu einem vielversprechenden Krebstherapeutikum wird [96].

In einem ersten Schritt wurden, via 2D- und 3D-Ähnlichkeitssuchen mit BA als Leitstruktur, neun niedermolekulare Substanzen identifiziert. Das Grundgerüst von BA wurde von sieben Treffern imitiert, wobei zwei gefundene Substanzen ein neues Grundgerüst aufwiesen und als „scaffold hopper“ für die Entwicklung neuer Wirkstoffe besonders interessant sind [17, 18]. Da eine 2D-Ähnlichkeitssuche die chemischen Eigenschaften von Molekülen vergleicht und „scaffold hopper“ nur über einen strukturellen Vergleich (3D-Ähnlichkeitssuche), bei der die räumliche Anordnung berücksichtigt wird [15], gefunden werden können, ist eine Kombination aus 2D- und 3D-Suche, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde, sehr sinnvoll. Im Folgenden wurden die Treffer bezüglich der Lipinski-Regeln untersucht, die vorgeben, dass eine Substanz, die mehr als eine der Regeln nicht erfüllt, für die Medikamentenentwicklung wenig vielversprechend ist [20]. Der berechnete logP für BA liegt über dem Grenzwert, der in den Lipinski-Regeln vorgegeben ist. Da BA als Naturstoff schon eine nachgewiesene biologische Aktivität besitzt und die Membrangängigkeit dadurch gewährleistet ist, ist eine Abweichung der Treffer bei diesem Kriterium zu vernachlässigen. Da die Moleküle sehr ähnlich zu BA sind, wiesen nur drei Substanzen abweichende Ergebnisse auf. Die Substanz NP-009993 hat mit 512,7 g/mol ein Molekulargewicht, das über dem geforderten Maximalwert von 500 g/mol liegt. NP-009993 ist, wie BA, auch ein Naturstoff und die Überschreitung dieses Grenzwertes kann auch in diesem Fall toleriert werden, da durch ihr Vorkommen in der Natur bereits eine biologische Aktivität vorausgesetzt wird. Dadurch, dass die „scaffold hopper“ ein auffallend anderes Grundgerüst haben als BA, wurde für sie auch ein abweichendes Ergebnis bei der Auswertung der Lipinski-Regeln erzielt. Diese Moleküle blieben innerhalb der geforderten Grenzwerte und befolgten alle Lipinski-Regeln.

Im Rahmen dieses Projektes kam ein neues Kriterium zur Identifizierung von aktiven BA-Analoga zum Einsatz, welches mit dem *in silico* Screening kombiniert wurde. Die biologische Aktivität der gefundenen Substanzen sollte, anhand eines Vergleiches mit Molekülen aus der Datenbank des NCI, bestimmt werden. In dieser Datenbank sind etwa 40 000 Substanzen abgelegt, deren Zytotoxizität in ~ 60 Tumorzelllinien getestet wurde [21]. Auf der Basis von 2D-Ähnlichkeiten wurden die gefundenen Substanzen mit denen aus der NCI-Datenbank verglichen und das GI₅₀-Profil der korrespondierenden NCI-Struktur sollte Aufschluss über die biologische Aktivität der BA-Analoga geben, was auf dem Prinzip, dass ähnliche physikochemische Eigenschaften im günstigsten Fall auch eine ähnliche biologische Aktivität bedeuten, beruhte [115]. Demnach sollten die Substanzen BAS 1279930, BN 10953, B-0442-B-10 und B-1000-B-09 nur einen schwachen oder keinen biologischen Effekt auf die Tumorzellen haben, da die mittleren GI₅₀-Werte der korrespondierenden NCI-Substanzen zwischen 20 und 85 µM liegen und somit eine geringere Zytotoxizität aufweisen, als die vergleichbaren Substanzen zu den anderen Treffern, die einen mittleren GI₅₀-Wert von 4,61 oder 5,19 µM haben. Da dieser Vergleich zum ersten Mal angewandt wurde, wurden die vermeintlich negativen Treffer als Negativkontrollen mitgeführt.

Die experimentelle Validierung der Ergebnisse des *in silico* Screenings und des Vergleiches mit den Strukturen aus der NCI-Datenbank haben gezeigt, dass die Vorhersage bezüglich der Aktivität der gefundenen Treffer eingetroffen ist. Moleküle, deren korrespondierende Substanz aus der NCI-Datenbank aktiv war, lösten signifikant Zelltod in Jurkat Zellen aus. Wohingegen Substanzen mit einem vermeintlich inaktiven korrespondierenden Partner aus der NCI-Datenbank auch keinen Effekt in den Zellen zeigten. Der Einfluss der strukturellen Unterschiede auf die Wirksamkeit wurde hierbei auch besonders deutlich. Die „scaffold hopper“ zeigten in den getesteten Zelllinien keine Wirkung, was auf das abweichende Grundgerüst zurückzuführen ist. Bei der Substanz BAS 1279930 hat die divergente Position der Carboxylgruppe am C20-Atom des Sechserings E einen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit. Die anderen pentazyklischen Verbindungen weisen diese Carboxylgruppe am C18- bzw. C17-Atom zwischen den Sechseringen D und E auf.

Somit zeigten fünf von neun Molekülen, die mittels computerbasierter Methoden als BA-Analoga identifiziert wurden, eine signifikante biologische Aktivität. Durch das neu

eingeführte Kriterium hätten die negativ getesteten Substanzen auch vor der experimentellen Phase ausgeschlossen werden können. Daher kann zusammenfassend gesagt werden, dass eine Kombination des „klassischen“ *in silico* Screenings mit den funktionellen Daten, die durch das NCI zur Verfügung gestellt werden, neue Möglichkeiten zur effizienten Identifizierung potentieller Krebstherapeutika über die experimentell getesteten hinaus ermöglicht.

5.4 IN SILICO IDENTIFIZIERUNG NEUER BCL-2-INHIBITOREN UND EINES NIEDERMOLEKULAREN BAX-AKTIVATORS

Die Bcl-2-Proteinfamilie spielt bei der Regulation von Apoptose eine entscheidende Rolle [178]. Innerhalb der Familie findet eine Unterteilung in drei Subfamilien statt. Die Erste besteht aus anti-apoptotisch wirkenden Proteinen, die vier Bcl-2-Homologie (BH)-Domänen besitzen. Bei der zweiten Subfamilie handelt es sich um Multidomänen-Proteine, die eine pro-apoptotische Funktion ausüben und die Domänen BH1 – BH3 besitzen, wohingegen die dritte Subfamilie, die ebenfalls pro-apoptotisch wirkt, nur die BH3-Domäne aufweist, was dieser Gruppe von Bcl-2-Proteinen den Namen BH3-only einbrachte [69]. BH3-only Proteine können eine direkte Aktivierung der Multidomänen-Bcl-2-Homologen Bax und Bak und eine Induktion der Oligomerisierung in der mitochondrialen Membran auslösen [179]. Desweiteren üben BH3-only Proteine ihre Aktivität durch die Bindung an anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder aus, wodurch die zelltodhemmende Wirkung von Bcl-2 aufgehoben wird [180]. Bcl-2 und Bcl-x_L, zwei anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie, tragen nicht nur zur Krebsentwicklung durch Hemmung der Apoptose bei. Sie sind ebenso verantwortlich für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber gegenwärtiger Krebstherapeutika [181, 182]. Daher sind Bcl-2-Proteine vielversprechende Targets für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Ein vielversprechender Ansatz, diesen Signalweg therapeutisch zu nutzen, ist der Einsatz niedermolekularer Bcl-2-Antagonisten. Neben Bcl-2 können auch weitere anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder, wie z.B. Bcl-x_L, Bcl-w und Mcl-1, gehemmt werden.

Degterev *et al.* haben gezeigt, dass der apoptotische Zelltod, der durch die niedermolekularen Strukturen BH3I-1 und BH3I-2 ausgelöst wird, sich analog zu dem verhält, der durch Überexpression von pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern ausgelöst wird, aber nicht zu einer Einlagerung von Bax in die mitochondriale Membran führt. Sie folgerten, dass BH3I-1 und BH3I-2 über die Bindung an die aus BH1-, BH2- und BH3-Domänen gebildete Bindungstasche von Bcl-2 wirken, wodurch pro-apoptotische BH3-only Proteine bzw. die Multidomänen-Proteine Bax und Bak freigesetzt werden [68, 101].

Diese Strukturen wurden als Leitstrukturen für ein *in silico* Screening verwendet, bei dem sieben Treffer mit einem Tanimoto-Koeffizienten über 0,85 identifiziert werden konnten, wodurch eine ähnliche biologische Aktivität, wie die der Leitstrukturen, als wahrscheinlich angenommen wurde. Durch besonders strenge Ausschlusskriterien sollte in diesem Modellprojekt die Auswirkung auf die Trefferquote untersucht werden. Daher wurde die Substanz 1S-55234 in weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt. Der berechnete Tanimoto-Koeffizient lag knapp über dem Grenzwert 0,85, aber die Wahrscheinlichkeit, dass eine Substanz, die eine Ähnlichkeit von $\sim 0,85$ zu einer Leitstruktur aufweist, ebenfalls biologisch aktiv ist, liegt bei 30 % [183]. Dieser Wert liegt weit über dem einer Hochdurchsatzmethode und es würden normalerweise Moleküle mit diesem Tanimoto-Koeffizienten weiter untersucht, was in diesem Projekt in der ersten experimentellen Testphase aber nicht durchgeführt wurde. Bei negativen Ergebnissen würde diese Substanz in einer zweiten Testphase berücksichtigt. Außerdem wurden die Moleküle A0746-0034828 und A2862-0120683 als Treffer ausgeschlossen, da die Untersuchung bezüglich der Lipinski-Regeln ergeben hat, dass die Anzahl der Wasserstoff-Donoren über dem geforderten Grenzwert liegen. Die im Anschluss durchgeführten Docking-Experimente mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-x_L und den vier verbliebenen Molekülen implizierten, dass die Moleküle 3S-91283 und 3S-12317 nicht den gewünschten inhibitorischen Effekt auslösen würden, da sie nur einen kleinen Teil der Bindungstasche abgedeckt haben und die berechneten Zähler auf eine geringe Bindungsaffinität hindeuteten. Im Gegensatz dazu zeigten die Substanzen BAS 0536121 und BAS 0289097 einen besseren *GOLDScore* als die Leitstrukturen und eine mit den Leitstrukturen vergleichbare Bindungskonstante, was zu der Annahme führte, dass diese eine gleiche oder sogar verbesserte Bindungsaffinität zu den anti-apoptotischen Proteinen aufweisen würden.

Funktionelle Experimente werden hierzu derzeit durchgeführt, um die Wirksamkeit und Bcl-2-/Bax-Abhängigkeit der Zelltodinduktion aufzuklären.

5.5 LICHTINDUZIERTE UND GEZIELTE APOPTOSEINDUKTION DURCH EINE SCHALTBARE BH3 HELIX

Die gezielte Beeinflussung der Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie, die maßgeblich an der Regulation des mitochondrialen Apoptose Signalweges beteiligt ist, ist ein vielversprechender Ansatz bei der Entwicklung neuer Krebstherapeutika. Das pro-apoptotische Protein Bid gehört zur Bcl-2-Familie, die durch das Vorhandensein von bis zu vier BH-Domänen gekennzeichnet ist. Die anti-apoptotischen Proteine (z.B. Bcl-2 und Bcl-x_L) weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit in den vier BH-Domänen auf, wohingegen die pro-apoptotischen Vertreter in die Multidomänen-Proteine (z.B. Bax und Bak), die die Domänen BH1 – BH3 enthalten, und die BH3-only Proteine (z.B. Bid und Bad), welche nur die BH3-Domäne besitzen, unterteilt werden [184]. Die BH1- und BH2-Domäne kommen in allen anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, aber nicht in allen pro-apoptotischen Proteinen vor. Hoch konservierte Aminosäuren in diesen Domänen werden für das Überleben der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L und für die Interaktion mit den Zelltod fördernden Proteinen benötigt [185]. Die BH3-Domäne, welche für die Bindung der pro-apoptotischen Vertreter an die hydrophobe Grube der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine verantwortlich ist, kommt in allen Proteinen der Bcl-2-Familie vor. Ein Verlust der BH4-Domäne kann die anti-apoptotische Wirkung von Proteinen wie Bcl-2 aufheben und sie zu einem Zelltod Promotor umwandeln [185, 186].

Die pro-apoptotischen Multidomänen-Proteine beeinflussen hauptsächlich das endoplasmatische Retikulum und die äußere mitochondriale Membran, was zu einer Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren führt. Die pro-apoptotisch wirkenden BH3-only Proteine wirken durch eine Interaktion mit den Multidomänen-Proteinen der Bcl-2-Familie [187]. Daher sollte das α -helikale Segment aus der BH3-Domäne von Bid zur Manipulation von physiologischen Prozessen genutzt werden. Durch den Einbau eines Photoschalters an die Aminosäuresequenz dieses Peptides sollte die Aktivität der Helix kontrolliert werden.

Erste Versuche haben gezeigt, dass wahrscheinlich eine Stabilisierung der veränderten BH3-Helix stattgefunden hat, da im Vergleich zum ursprünglichen Peptid die Apoptoserate um das 2,5 fache gesteigert werden konnte. Das Ausgangspeptid ist mit

einer Halbwertszeit von ~ 3 h sehr instabil und zeigt daher nur eine geringere Apoptoserate [188]. Außerdem könnte, durch den Einbau des Photoschalters (cis-Konformation), eine Stabilisierung der helikalen Struktur herbeigeführt worden sein, was eine Steigerung der Aktivität bewirkte. In weiteren Versuchen konnte, durch Bestrahlung mit einer geeigneten Wellenlänge, eine Aktivierung bzw. Inaktivierung der BH3 Helix gezeigt werden. Während die inaktive Form eine Apoptoserate von 27 % erreichte, wurde bei der aktivierten Helix eine Apoptoserate von 70 % gemessen. Es ist also möglich, durch den Einbau des Photoschalters Hemithioindigo an das α -helikale Segment aus der BH3-Domäne von Bid, Apoptose kontrolliert auszulösen. Durch die gezielte Inaktivierung am definierten Wirkort wird der Organismus weniger Nebenwirkungen ausgesetzt, was besonders bei der Chemotherapie wünschenswert wäre. Der Einsatz von Photoschaltern ist daher vielversprechend für die Behandlung von Krankheiten, für die gewebsspezifische Effekte wünschenswert sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Modellprojekte haben gezeigt, dass die Kombination von *in silico* und *in vitro* Screening effektiv und zuverlässig für das Auffinden von neuen, biologisch aktiven Substanzen ist. Die Trefferquote war im Vergleich zu Hochdurchsatzmethoden (Trefferquote: ~ 2 %) um ein Vielfaches besser (Tab. 18) [156].

Modellprojekt	Trefferquote [%]
Signalosom-Inhibitoren	20
Betulinsäure-Analoga	56
Bcl-2-Inhibitoren	(100)

Tabelle 18: Trefferquoten der Modellprojekte.

Die Trefferquote konnte durch das gezielte projektbezogene Verwenden von neuen zusätzlichen Ausschlusskriterien (z.B. GI_{50} Profile des NCI) verbessert werden.

5.6 ERSTELLUNG EINER NATURSTOFFDATENBANK

Viele Treffer, die im Rahmen der vorgestellten und weiteren Modellprojekten erzielt wurden, waren Naturstoffe oder Derivate von Naturstoffen. Diese Beobachtung stimmt mit der Tatsache überein, dass etwa 50 % der Medikamente, die durch die FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassen sind, ebenfalls Naturstoffe sind oder direkt bzw. indirekt von ihnen abstammen [189]. Naturstoffe geraten daher immer mehr in den Fokus der Wirkstoffforschung. Tulp und Bohlin nahmen an, dass ein Naturstoff, der Spezies übergreifend vorkommt, eine wichtige biologische Funktion haben muss, wie z.B. einen Effekt auf ein spezifisches Target, da eine zufällige Produktion eines Naturstoffs in nicht verwandten Spezies sehr unwahrscheinlich ist [190]. Aktuell sind etwa 200 000 Naturstoffe bekannt und es wird angenommen, dass noch viele weitere folgen werden [190]. Obwohl durch kombinatorische Chemie eine große Anzahl von synthetischen Molekülen hergestellt wird, die den Medikamenten bezüglich der Größe und Eigenschaften sehr ähnlich sind, kann ihnen, im Gegensatz zu Naturstoffen, noch keine Interaktion mit biologisch relevanten Targets nachgewiesen werden [191]. Vergleicht man die Eigenschaften von synthetischen und natürlichen Molekülen mit denen von Medikamenten, wird die Besonderheit der Naturstoffe, besonders im Bezug auf die Diversität der Grundgerüste und der großen Anzahl von chiralen Zentren, deutlich [192]. In den Jahren 1981-2002 waren 62 % der potentiell neuen Krebswirkstoffe natürlichen Ursprungs [193]. Viele marine Naturstoffe sind in Phase II der klinischen Tests gegen Krebs, Allergien und kognitive Erkrankungen [194]. Die chemische Diversität der Naturstoffe ist immens und eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Wirkstoffe in der Medizin [195]. Obwohl die meisten der zugelassenen Medikamente einen natürlichen Ursprung haben, ist deren Verfügbarkeit und Herkunft oft unklar [196, 197]. Es gibt viele kommerzielle Datenbanken [198, 199, 200], aber in der „SuperNatural Database“ (Erstellt in Zusammenarbeit mit M. Dunkel) sind zum ersten Mal die 3D-Strukturen und Konformere von > 45 000 käuflichen Naturstoffen, Derivaten und Analoga, sowie deren Hersteller, frei verfügbar zusammengefasst [201]. Zu jedem Naturstoff sind ausführliche Informationen bezüglich verschiedener struktureller und chemischer Eigenschaften abgelegt (Abb. 48 E). Die Datenbank enthält ~ 2 500 bekannte Naturstoffe, die durch ihre CAS-Nummer (Chemical Abstracts) charakterisiert sind und als Startpunkt für

Ähnlichkeitssuchen dienen können (Abb. 48 A + B). Durch die Implementierung eines Marvin Applets können eigene Moleküle für Ähnlichkeitssuchen importiert werden (Abb. 48 C) [202]. Zur Berechnung der Ähnlichkeit zweier Moleküle wurden der Tanimoto-Koeffizient [12] und ein 3D-Überlagerungsalgorithmus [15] in die Datenbank eingebunden (Abb. 48 D). Um mögliche Anwendungsgebiete für die gefundenen Naturstoffe zu bestimmen, wurde eine Suche nach ähnlichen Medikamenten in der „SuperDrug Database“ ermöglicht, die medizinische Indikationen enthält, welche von der WHO (*World Health Organization*) eingestuft wurden [203, 204].

The screenshot displays the Super Natural Database website. The main header is green with the title 'Super Natural Database'. Below the header, there is a navigation menu on the left with links: Home, Compound Search, FAQ, List of Suppliers, Statistics, Contact, and Links. The 'Compound Search' section is active, showing a 'Type of Search' form with fields for Name, CAS-Registry Number, Synonym, Systematic Name, Molecular Formula, Molweight, Chiral Centers, LogP, and Classification. To the right of the form are example values for each field. A 'Search' button is at the bottom of the form.

Below the search form, there is a table of search results. The table has columns: ID, Structure, Similarity, Supplier, and 3D Superposition. Two results are shown:

ID	Structure	Similarity	Supplier	3D Superposition
01502223		100.00	MicroSource	<input type="radio"/> Molecule 1 <input type="radio"/> Molecule 2 <input type="button" value="Go"/>
01504044		87.41	MicroSource	<input type="radio"/> Molecule 1 <input type="radio"/> Molecule 2 <input type="button" value="Go"/>

Below the table, there is a section titled 'PROPERTIES OF "01502223"'. It contains a table of properties:

PROPERTY	VALUE
NUMBER OF ROTATABLE BONDS:	2
NUMBER OF CHIRAL CENTERS:	0
NUMBER OF HYDROGEN BOND ACCEPTORS:	3
NUMBER OF HYDROGEN BOND DONORS:	3
LOG P:	3.014
SUM OF PARTIAL CHARGES:	0
SUM OF FORMAL CHARGES:	0
MOLECULAR DENSITY:	1.50
SURFACE AREA:	0.00

Below the properties table, there is a section titled 'E' showing the 3D Superposition of the two molecules. It contains three sub-images: 'STRUCTURE 1', 'OVERLAP', and 'STRUCTURE 2'. The 'OVERLAP' image shows the two molecules superimposed, with the best fit highlighted in purple.

Abbildung 48: Screenshot von der Internetseite der „SuperNatural Database“.

A Navigationsseite und Anfrageformular zum Starten einer Ähnlichkeitssuche ausgehend von den 2 500 bekannten Naturstoffen **B** Ergebnis einer Anfrage mit der Option einer 3D-Überlagerung (3D-Superposition). Die Berechnung des Tanimotokoeffizienten hat zwei Treffer mit einer Ähnlichkeit (Similarity) von 100 % und 87,41 % zur Leitstrukturen ergeben. Mit der linken Maustaste können die Moleküle gedreht werden, verschiedene Darstellungsmöglichkeiten sind eingebunden (rechte Maustaste) und detaillierte Informationen bezüglich der Eigenschaften können über den „FULL INFO“ Button bezogen werden. Als Hersteller ist in diesem Fall die Firma MicroSource angegeben **C** Screenshot des Marvin Applets, welches das Importieren und Zeichnen eigener Strukturen für die Ähnlichkeitssuche ermöglicht **D** Berechnete Eigenschaften für eine Struktur **E** Ergebnis einer 3D-Überlagerung. Alle Konformere beider Strukturen werden überlagert und das beste Ergebnis wird angezeigt. Informationen über die Anzahl der überlagerten Atome und den rmsd Wert sind angegeben.

Etwa 300 Naturstoffe aus der „SuperNatural Database“ sind identisch zu aktiven Bestandteilen verschiedenster Medikamente und 8 % (3600) der Naturstoffe haben im Vergleich mit zugelassenen Medikamenten einen Tanimoto-Koeffizienten von > 0,85, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine ähnliche biologische Aktivität schließen

lässt [115]. Beispielhaft wurde eine Ähnlichkeitssuche mit Naturstoffen, die als Medikament, als Leitstruktur für ein Medikament oder als Naturstoff in klinischen Phasen gegen onkologische Erkrankungen bekannt sind, durchgeführt (Tab. 19).

Naturstoff	Status (Referenz)	Ähnliche Moleküle in der „SuperNatural Database“ (Tanimoto > 0.85)	Analytisch, Chemisch, Therapeutisch (ATC): Klassifizierungscode*
Onkologie			
Camptothecin	Klinische Phase I & II & III [205]	7	L01* (Antineoplastisch)
Paclitaxel	Leitstruktur von Taxol® [206]	5	L01CD* (Taxane)
Protopanaxadiol	Klinische Phase I [205]	17	L01* (Antineoplastisch)
Triptolide	Klinische Phase I [205]	18	L01* (Antineoplastisch)
Vinblastine	Leitstruktur von Velban® [206]	9	L01CA* (Vinca Alkaloide und Analoga)
Doxorubicin	Leitstruktur von Adriblastin® [207]	12	L01DB* (Anthrazykline und ähnliche Substanzen)
Staurosporine	Klinische Phase I & II & III [205]	4	L01* (Antineoplastisch)
Halichondrin B	Klinische Phase I [205]	5	L01* (Antineoplastisch)

* Analytisch, Chemisch, Therapeutisch (ATC) Klassifizierungscode der WHO, der die therapeutische Subgruppe angibt

Tabelle 19: Vergleich von bekannten Naturstoffen mit Molekülen aus der „SuperNatural Database“.

Naturstoffe (für onkologische Erkrankungen), die als Medikamente oder als Leitstrukturen für Medikamente bekannt sind, sowie Naturstoffe, die sich in verschiedenen klinischen Phasen befinden, haben viele ähnliche Moleküle in der „SuperNatural Database“, die einen Tanimoto-Koeffizienten von > 0,85 haben. Der ATC-Code für die einzelnen Naturstoffe gibt das therapeutische Anwendungsgebiet an.

Es gibt viele Naturstoffe in der „SuperNatural Database“, die, durch den hohen Tanimoto-Koeffizienten, als mögliche neue Wirkstoffe oder Leitstrukturen in Frage kommen. Ergänzend ist die ATC (Analytisch, Chemisch, Therapeutisch) Klassifizierung der WHO angegeben, die die therapeutische Subgruppe (Anwendungsgebiete) definiert [204]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Datenbank eine ausgezeichnete Quelle

zum Auffinden von biologisch aktiven Naturstoffen im Bereich der onkologischen Forschung ist. Weitere Auswertungen für verschiedene Anwendungsgebiete (Daten nicht gezeigt) haben ergeben, dass bei einer Vielzahl von medizinischen Forschungsgebieten potentielle Wirkstoffe in der „SuperNatural Database“ vorhanden sind.

6 AUSBLICK

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich für jedes der drei Modellprojekte Möglichkeiten zu weiterführenden Untersuchungen.

Die identifizierten Kinaseinhibitoren sollten, mittels eines Matrigel-Modells [208], auf ihre Fähigkeit, die Angiogenese zu hemmen, genauer untersucht werden. Außerdem ist für die bereits beim Patentamt angemeldete Substanz BTB14431 ein Tierversuchsantrag genehmigt, der neue Erkenntnisse über die tumorwachstumshemmende Wirkung bringen soll.

Im Rahmen des Betulinsäure Projektes wurde eine neue Methode zur Bewertung von *in silico* Screening Treffern eingeführt, die zu positiven Ergebnissen führte. Diese Methode sollte weiter untersucht und verbessert werden. Der strukturelle Vergleich könnte durch einen Vergleich von GI₅₀ Werten ergänzt werden. So könnten eigene experimentell erhobene Daten mit Wirkprofilen der NCI-Datenbank verglichen werden und zum Auffinden von möglichen Wirkmechanismen dienen.

Nach Abschluss der funktionellen Experimente mit den potentiellen Bcl-2 Inhibitoren, sollten diese auch auf ihre Wirkung auf das pro-apoptotische Protein Bax untersucht werden, da das Auffinden eines niedermolekularen Bax-Aktivators von großem Interesse ist.

Auf alle *in silico* Screening Projekte bezogen kann gesagt werden, dass die gefundenen Treffer sehr vielversprechend aussehen und daher zur weiteren Optimierung oder als Leitstrukturen für weitere Suchen dienen sollten.

Weiterhin sollten die Ergebnisse des photoschaltbaren α -helikalen Peptides mit Versuchen in verschiedenen Zellsystemen zur Verifizierung des Wirkmechanismus ergänzt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse eröffnen sich bei vielen weiteren Forschungsprojekten neue Möglichkeiten für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren, die durch Lichteinstrahlung gezielt aktiviert werden können.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion
AER	Apikale ektodermale Randleiste
AP1	Aktivator Protein 1
APAF-1	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATC	Anatomisch Chemisch Therapeutisch
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Betulinic Acid
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl3	B-cell lymphoma 3 encoded protein
BH1-BH4	Bcl-2 Homologie Domänen 1-4
BH3I	BH3 Inhibitor
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	Circa
CAP	Compounds Available for Purchase
CAS	Chemical Abstracts
CK2	Caseinkinase 2
cm	Zentimeter
CMC	Comprehensive Medicinal Chemistry
COP9	constitutive photomorphogenic gene 9
COUP-	COUP-Transkriptionsfaktor 1
TF1	
CRD	Cystein-reiche Domäne
CSN	COP9 Signalosom
Cul1 und 2	Cullin 1 und 2
D	Asparaginsäure
DAP	Diaminopropionsäure
DISC	Death-inducing signaling complex
DKO	Doppelknockout
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTP	Developmental Therapeutics Program
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF3e/ Int-6	Eukaryontischer Translations-Initiations-Komplex 3
ELISA	Enzyme linked immunisorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Scan
FADD	Fas associated death domain
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GI50	50 % growth inhibition
HIF-1α	Hypoxia inducible factor-1 alpha
HIV-1	Human immunodeficiency virus 1 accessory protein
VPR	

HPO	Hepatopoietin
HTS	High-throughput Screening
IAPs	Inhibitor von Apoptose Proteinen
IBS	InterBioScreen
ICSBP	Interferon consensus sequence-binding protein
Id1	Inhibitor of differentiation 1
Id3	Inhibitor of differentiation 3
IKK γ	I κ B Kinase γ
IP3-5/6-Kinase	Inositol-1,3,4-triphosphat-5/6-Kinase
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazoly carbocyaninjodid
logP	Dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten der Konzentration einer Chemikalie zwischen n-Oktanol und Wasser
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LSD	Lysergsäurediethylamid
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MPN-Domäne	Mpr1-Pad1-N-terminal-Domäne
Mrd	Milliarde
NCI	National Cancer Institute
NMR	Kernresonanzspektroskopie, engl.: nuclear magnetic resonance
NTP	National Toxicology Program
PBS	Phosphatpuffer Saline
PDB	Protein-Datenbank
PGP9.5	siehe UCH
PI	Propidiumjodid
PINT-Domäne	Proteasome subunits, Int-6, Nip-1, and Trip15-Domäne
PKD/	Proteinkinase D
PKC μ	
PMF-1	Polyamine-modulated factor 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Progesteron Rezeptor
Q	Glutamin
QSTR	Quantitative Structure Toxicity Relationship
Rbx1	RING box protein 1
rLHR	Precursor of the lutropin/choriogonadotropin receptor
rmsd	Root means square deviation
rpm	Rounds per minute
RPN	Regulatory particle non-ATPase
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung, engl.: structure activity relationship
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	small hairpin RNA
SRC-1	Steroid receptor co-activator 1
Tat	Trans-Activator of Transcription

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THR	Threonin
TK	Tanimoto-Koeffizient
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TR	Thyroid Rezeptor
TRADD	TNF-receptor associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRC8	Translocation in renal carcinoma on chromosome 8
UCH	Ubiquitin C-terminal Hydrolase
VDAC2	Voltage-dependent anion channel 2
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Fingerprint einer Kleinstruktur.	2
Abbildung 2: Anzahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2002.	5
Abbildung 3: Darstellung der altersstandardisierten Erkrankungsrate je 100 000 Bewohner für Frauen und Männer.	6
Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme des CSN.	7
Abbildung 5: Darstellung der bisher identifizierten Interaktionspartner des CSN.	8
Abbildung 6: Zelltod bei der Extremitätenentwicklung der Maus.	10
Abbildung 7: Darstellung des extrinsischen Apoptoseweges.	12
Abbildung 8: Darstellung des intrinsischen Apoptoseweges.	13
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Bcl-2-Familienmitglieder nach struktureller und funktioneller Klassifizierung in Säugern.	14
Abbildung 10: Aktivator-Modell zur Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie.	15
Abbildung 11: Letai-Modell zur Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie.	16
Abbildung 12: Inhibitor-Modell zur Regulation der Bcl-2-Proteinfamilie.	17
Abbildung 13: Modell der Wirkung von Curcumin und Emodin auf den proteolytischen Abbau von p53 und c-Jun.	18
Abbildung 14: 3D-Darstellung der verwendeten Leitstrukturen Curcumin und Emodin.	19
Abbildung 15: 3D-Struktur der Betulinsäure.	19
Abbildung 16: 3D-Strukturen der Bcl-2-Inhibitoren.	21
Abbildung 17: 3D-Darstellung des Photoschalters Hemithioindigo.	22
Abbildung 18: Berechnungsformel des Tanimoto-Koeffizienten (TK).	25
Abbildung 19: Darstellung der verschiedenen Schritte des 3D-Überlagerungsalgorithmus.	27
Abbildung 20: 3D-Struktur von A Curcumin und B Emodin.	50
Abbildung 21: 3D-Überlagerung und 2D-Vergleich von Curcumin und Piceatannol.	51
Abbildung 22: Docking-Ergebnisse für Emodin und Curcumin.	53
Abbildung 23: Messung der c-Jun-Phosphorylierung in Anwesenheit von Piceatannol und BTB14431.	56
Abbildung 24: Effekt der von Curcumin und Emodin abgeleiteten Inhibitoren auf die Stabilität von c-Jun und p53.	58
Abbildung 25: MTT-Test zur Untersuchung der Zellvitalität nach der Behandlung mit den Kinaseinhibitoren.	60
Abbildung 26: Apoptose oder Nekrose: Annexin-V-FITC / Propidiumjodid (PI) Doppelfärbung von HeLa-Zellen nach der Behandlung mit den CSN-Kinaseinhibitoren.	61

Abbildung 27: Messung der Caspase-Aktivität nach der Behandlung der Zellen mit den von Curcumin und Emodin abgeleiteten Inhibitoren.	62
Abbildung 28: DNA-Fragmentierung in HeLa-Zellen nach 48 h Inkubation mit den Kinaseinhibitoren ist konzentrationsabhängig.....	63
Abbildung 29: 3D-Struktur von Betulinsäure (BA) und die dazugehörigen Konformere.	64
Abbildung 30: Der durch BA ausgelöste Zelltod entspricht dem Apoptose Phentypen.	65
Abbildung 31: Betulinsäure (BA) induziert Apoptose in Jurkat und BJAB Zellen.	66
Abbildung 32: Betulinsäure löst Apoptose in DU145 Zellen unabhängig von Bax aus.	68
Abbildung 33: Induktion von Apoptose durch Betulinsäure in HCT116.	70
Abbildung 34: Induktion von Apoptose durch Betulinsäure in MEF Zellen.....	71
Abbildung 35: Inhibition der Betulinsäure-induzierten DNA-Fragmentierung durch einen Pan-Caspase-Inhibitor.	72
Abbildung 36: Inhibition der Betulinsäure-induzierten DNA-Fragmentierung in APAF-1- und Procaspase-9-defizienten MEF Zellen.....	73
Abbildung 37: 3D-Überlagerung von Betulinsäure (blau) und NP-009993 (Grün).	74
Abbildung 38: GI ₅₀ -Werte [µM] der NCI-Substanzen (NSC Nummer).	79
Abbildung 39: Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) durch Betulinsäure und deren Analoga in Jurkat A3 Zellen.	80
Abbildung 40: Messung der Fragmentierung von genomischer DNA mittels Durchflußzytometrie durch Betulinsäure und deren Analoga.....	81
Abbildung 41: 3D-Strukturen der Bcl-2-Inhibitoren und die dazugehörigen Konformere.	82
Abbildung 42: Docking-Ergebnisse von BH3I-1 und Analoga.	85
Abbildung 43: Docking-Ergebnisse von BH3I-2 und Analogon.	86
Abbildung 44: 3D-Strukturen der Bcl-2-Inhibitoren und deren Analoga.....	87
Abbildung 45: Modell des α -helikalen BH3-Peptides aus dem pro-apoptotischen Protein Bid mit eingebautem Photoschalter (Hemithioindigo).	88
Abbildung 46: Annexin-V-FITC / PI-Doppelfärbung mit der BH3-Helix in Jurkat A3 Zellen. ...	89
Abbildung 47: DNA-Fragmentierung nach Aktivierung bzw. Inaktivierung der BH3-Helix.	90
Abbildung 48: Screenshot von der Internetseite der „SuperNatural Database“.	106

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antikörper.....	33
Tabelle 2: Verwendete niedermolekulare Substanzen und die dazugehörigen Hersteller.....	34
Tabelle 3: Verwendete Geräte und die dazugehörigen Hersteller.	35
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien und die dazugehörigen Hersteller.	36
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und die dazugehörigen Hersteller.	37
Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.	38
Tabelle 7: Verwendete Nährmedien und der dazugehörige Hersteller.	39
Tabelle 8: Verwendete Kits und die dazugehörigen Hersteller.	39
Tabelle 9: Beschreibung der verwendeten Zelllinien.	40
Tabelle 10: Unterteilung der potentiellen Inhibitoren für die CSN-assoziierten-Kinasen.	52
Tabelle 11: Bindungsaffinitäten für die potentiellen Kinaseinhibitoren.....	54
Tabelle 12: Bestimmung der IC ₅₀ -Werte anhand von Kinaseassays.	57
Tabelle 13: Ergebnisse des in silico Screenings mit Betulinsäure als Leitstruktur.	75
Tabelle 14: Auswertung der Betulinsäure und der Analoga bezüglich der Lipinski-Regeln....	76
Tabelle 15: Treffer des in silico Screenings und die ähnlichsten Substanzen aus dem NCI-Projekt.....	77
Tabelle 16: Ergebnisse des in silico Screenings mit BH3I-1 und BH3I-2 als Leitstrukturen...83	
Tabelle 17: GOLDScore und $\Delta G_{\text{binding}}$ für BH3I-1, BH3I-2 und Analoga.	84
Tabelle 18: Trefferquoten der Modellprojekte.	103
Tabelle 19: Vergleich von bekannten Naturstoffen mit Molekülen aus der „SuperNatural Database“.	107
Tabelle 20: 35 Treffer des in silico Screenings mit Curcumin und Emodin.....	131
Tabelle 21: Datenbank, die für die in silico Screenings verwendet wurde.....	132

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Cahn, A. and Hepp, P. (1886): Das Antifebrin, ein neues Fiebermittel, Ztblt. klin. Med. 7, pp. 561-64.
- [2] Fleming, A. (1929): The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, British Journal of Experimental Pathology 10, pp. 226-36.
- [3] Hofmann, A. (1970): Notes and documents concerning the discovery of LSD, Agents Actions 1 [3], pp. 148-50.
- [4] English, D. C. (1960): Librium, a new non-sedative neuroleptic drug: a clinical evaluation, Curr Ther Res Clin Exp 2, pp. 88-91.
- [5] Triggle, D. J. (2007): Drug discovery and delivery in the 21st century, Med Princ Pract 16 [1], pp. 1-14.
- [6] Kubinyi, H. (2001): "Der Wandel in der Arzneimittelforschung. Vom glücklichen Zufall zum gezielten Entwurf" <http://www.forschung-leben.ch/download/mb59.pdf>.
- [7] Jalaie, M. and Shanmugasundaram, V. (2006): Virtual screening: are we there yet?, Mini Rev Med Chem 6 [10], pp. 1159-67.
- [8] Carnero, A. (2006): High throughput screening in drug discovery, Clin Transl Oncol 8 [7], pp. 482-90.
- [9] Davies, J. W.; Glick, M. and Jenkins, J. L. (2006): Streamlining lead discovery by aligning in silico and high-throughput screening, Curr Opin Chem Biol 10 [4], pp. 343-51.
- [10] Willett, P. (1998): Chemical Similarity Searching, J Chem Inf Comput Sci 38 [6], pp. 983-996.
- [11] Chen, X. and Reynolds, C. H. (2002): Performance of similarity measures in 2D fragment-based similarity searching: comparison of structural descriptors and similarity coefficients, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 42 [6], pp. 1407-14.
- [12] Patterson, D. E.; Cramer, R. D.; Ferguson, A. M.; Clark, R. D. and Weinberger, L. E. (1996): Neighborhood behavior: a useful concept for validation of "molecular diversity" descriptors, J Med Chem 39 [16], pp. 3049-59.
- [13] Lorenzen, S. (2006): Molekulare Ähnlichkeiten und deren biologische Bedeutung, PhD Thesis, Humboldt-Universität zu Berlin.
- [14] Durant, J. L.; Leland, B. A.; Henry, D. R. and Nourse, J. G. (2002): Reoptimization of MDL keys for use in drug discovery, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 42 [6], pp. 1273-80.
- [15] Thimm, M.; Goede, A.; Hougardy, S. and Preissner, R. (2004): Comparison of 2D similarity and 3D superposition. Application to searching a conformational drug database, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 44 [5], pp. 1816-22.
- [16] Raevsky, O. A.; Trepalin, S. V.; Trepalina, H. P.; Gerasimenko, V. A. and Raevskaja, O. E. (2002): SLIPPER-2001 -- software for predicting molecular properties on the basis of physicochemical descriptors and structural similarity, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 42 [3], pp. 540-9.

- [17] Zhang, Q. and Muegge, I. (2006): Scaffold hopping through virtual screening using 2D and 3D similarity descriptors: ranking, voting, and consensus scoring, *J Med Chem* 49 [5], pp. 1536-48.
- [18] Renner, S. and Schneider, G. (2006): Scaffold-hopping potential of ligand-based similarity concepts, *ChemMedChem* 1 [2], pp. 181-5.
- [19] Butina, D.; Segall, M. D. and Frankcombe, K. (2002): Predicting ADME properties in silico: methods and models, *Drug Discov Today* 7 [11 Suppl], pp. S83-8.
- [20] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W. and Feeney, P. J. (2001): Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv Drug Deliv Rev* 46 [1-3], pp. 3-26.
- [21] Weinstein, J. N.; Myers, T. G.; O'Connor, P. M.; Friend, S. H.; Fornace, A. J., Jr.; Kohn, K. W.; Fojo, T.; Bates, S. E.; Rubinstein, L. V.; Anderson, N. L.; Buolamwini, J. K.; van Osdol, W. W.; Monks, A. P.; Scudiero, D. A.; Sausville, E. A.; Zaharevitz, D. W.; Bunow, B.; Viswanadhan, V. N.; Johnson, G. S.; Wittes, R. E. and Paull, K. D. (1997): An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer, *Science* 275 [5298], pp. 343-9.
- [22] Kirchner, F (2003): Thema 2: Leitstruktursuche und Optimierung.
- [23] Statistisches-Bundesamt-Deutschland Todesursachen,
<http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab19.php>.
- [24] Robert-Koch-Institut Krebs in Deutschland,
http://www.rki.de/cln_049/nn_203956/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Broschue/kid2006.templateId=raw.property=publicationFile.pdf/kid2006.pdf.
- [25] Seeger, M.; Kraft, R.; Ferrell, K.; Bech-Otschir, D.; Dumdey, R.; Schade, R.; Gordon, C.; Naumann, M. and Dubiel, W. (1998): A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits, *Faseb J.* 12 [6], pp. 469-78.
- [26] Claret, F. X.; Hibi, M.; Dhut, S.; Toda, T. and Karin, M. (1996): A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors, *Nature* 383 [6599], pp. 453-7.
- [27] Lee, J. W.; Choi, H. S.; Gyuris, J.; Brent, R. and Moore, D. D. (1995): Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor, *Mol Endocrinol* 9 [2], pp. 243-54.
- [28] Deng, X. W.; Dubiel, W.; Wei, N.; Hofmann, K.; Mundt, K.; Colicelli, J.; Kato, J.; Naumann, M.; Segal, D.; Seeger, M.; Carr, A.; Glickman, M. and Chamovitz, D. A. (2000): Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development, *Trends Genet* 16 [5], pp. 202-3.
- [29] Kapelari, B.; Bech-Otschir, D.; Hegerl, R.; Schade, R.; Dumdey, R. and Dubiel, W. (2000): Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome, *J Mol Biol* 300 [5], pp. 1169-78.
- [30] Schwechheimer, C. (2004): The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development, *Biochim Biophys Acta* 1695 [1-3], pp. 45-54.

- [31] Hofmann, K. and Bucher, P. (1998): The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes, *Trends Biochem Sci* 23 [6], pp. 204-5.
- [32] McCullough, J.; Clague, M. J. and Urbe, S. (2004): AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase, *J Cell Biol* 166 [4], pp. 487-92.
- [33] Cope, G. A.; Suh, G. S.; Aravind, L.; Schwarz, S. E.; Zipursky, S. L.; Koonin, E. V. and Deshaies, R. J. (2002): Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1, *Science* 298 [5593], pp. 608-11.
- [34] Aravind, L. and Ponting, C. P. (1998): Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation, *Protein Sci* 7 [5], pp. 1250-4.
- [35] Tsuge, T.; Matsui, M. and Wei, N. (2001): The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain, *J Mol Biol* 305 [1], pp. 1-9.
- [36] Huang, X.; Hetfeld, B. K.; Seifert, U.; Kahne, T.; Kloetzel, P. M.; Naumann, M.; Bech-Otschir, D. and Dubiel, W. (2005): Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction, *Febs J* 272 [15], pp. 3909-17.
- [37] Hetfeld, B. K. (2006): Die Funktion des COP9 Signalosoms und des assoziierten USP15 im Ubiquitin-Proteasomsystem, PhD Thesis, Humboldt-Universität zu Berlin.
- [38] Sun, Y.; Wilson, M. P. and Majerus, P. W. (2002): Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1, *J Biol Chem* 277 [48], pp. 45759-64.
- [39] Uhle, S.; Medalia, O.; Waldron, R.; Dumdey, R.; Henklein, P.; Bech-Otschir, D.; Huang, X.; Berse, M.; Sperling, J.; Schade, R. and Dubiel, W. (2003): Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome, *Embo J.* 22 [6], pp. 1302-12.
- [40] Pagano, M. A.; Cesaro, L.; Meggio, F. and Pinna, L. A. (2006): Protein kinase CK2: a newcomer in the 'druggable kinome', *Biochem Soc Trans* 34 [Pt 6], pp. 1303-6.
- [41] Marklund, U.; Lightfoot, K. and Cantrell, D. (2003): Intracellular location and cell context-dependent function of protein kinase D, *Immunity* 19 [4], pp. 491-501.
- [42] Rykx, A.; De Kimpe, L.; Mikhalap, S.; Vantus, T.; Seufferlein, T.; Vandenheede, J. R. and Van Lint, J. (2003): Protein kinase D: a family affair, *FEBS Lett.* 546 [1], pp. 81-6.
- [43] Bech-Otschir, D.; Seeger, M. and Dubiel, W. (2002): The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis, *J. Cell. Sci.*, 115, Pt 3, 467-73, Feb 1, 11861754
- [44] Bech-Otschir, D.; Kraft, R.; Huang, X.; Henklein, P.; Kapelari, B.; Pollmann, C. and Dubiel, W. (2001): COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system, *Embo J.* 20 [7], pp. 1630-9.
- [45] Shaulian, E. and Karin, M. (2002): AP-1 as a regulator of cell life and death, *Nat Cell Biol* 4 [5], pp. E131-6.
- [46] Vogelstein, B.; Lane, D. and Levine, A. J. (2000): Surfing the p53 network, *Nature* 408 [6810], pp. 307-10.

- [47] Slee, E. A.; O'Connor, D. J. and Lu, X. (2004): To die or not to die: how does p53 decide?, *Oncogene* 23 [16], pp. 2809-18.
- [48] Pollmann, C.; Huang, X.; Mall, J.; Bech-Otschir, D.; Naumann, M. and Dubiel, W. (2001): The constitutive photomorphogenesis 9 signalosome directs vascular endothelial growth factor production in tumor cells, *Cancer Res.* 61 [23], pp. 8416-21.
- [49] Strasser, A.; O'Connor, L. and Dixit, V. M. (2000): Apoptosis signaling, *Annu Rev Biochem* 69, pp. 217-45.
- [50] Golstein, P.; Aubry, L. and Levraud, J. P. (2003): Cell-death alternative model organisms: why and which?, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 [10], pp. 798-807.
- [51] Chen, Y. and Zhao, X. (1998): Shaping limbs by apoptosis, *J Exp Zool* 282 [6], pp. 691-702.
- [52] Clarke, P. G. and Clarke, S. (1996): Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena, *Anat Embryol (Berl)* 193 [2], pp. 81-99.
- [53] Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 26 [4], pp. 239-57.
- [54] Yan, Q.; Liu, J. P. and Li, D. W. (2006): Apoptosis in lens development and pathology, *Differentiation* 74 [5], pp. 195-211.
- [55] Hinds, M. G. and Day, C. L. (2005): Regulation of apoptosis: uncovering the binding determinants, *Curr Opin Struct Biol* 15 [6], pp. 690-9.
- [56] Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1986): Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*, *Cell* 44 [6], pp. 817-29.
- [57] Vaux, D. L.; Cory, S. and Adams, J. M. (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature* 335 [6189], pp. 440-2.
- [58] Strasser, A.; Harris, A. W.; Bath, M. L. and Cory, S. (1990): Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2, *Nature* 348 [6299], pp. 331-3.
- [59] McDonnell, T. J. and Korsmeyer, S. J. (1991): Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18), *Nature* 349 [6306], pp. 254-6.
- [60] Green, D. R. and Evan, G. I. (2002): A matter of life and death, *Cancer Cell* 1 [1], pp. 19-30.
- [61] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer, *Cell* 100 [1], pp. 57-70.
- [62] Thompson, C. B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267 [5203], pp. 1456-62.
- [63] Vaux, D. L. and Flavell, R. A. (2000): Apoptosis genes and autoimmunity, *Curr Opin Immunol* 12 [6], pp. 719-24.
- [64] Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998): Death receptors: signaling and modulation, *Science* 281 [5381], pp. 1305-8.

- [65] Yan, N. and Shi, Y. (2005): Mechanisms of apoptosis through structural biology, *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, pp. 35-56.
- [66] Kischkel, F. C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor, *Embo J* 14 [22], pp. 5579-88.
- [67] MacFarlane, M. and Williams, A. C. (2004): Apoptosis and disease: a life or death decision, *EMBO Rep* 5 [7], pp. 674-8.
- [68] Daniel, P. T.; Schulze-Osthoff, K.; Belka, C. and Guner, D. (2003): Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins, *Essays Biochem* 39, pp. 73-88.
- [69] Papadopoulos, K. (2006): Targeting the Bcl-2 family in cancer therapy, *Semin Oncol* 33 [4], pp. 449-56.
- [70] Cory, S. and Adams, J. M. (2002): The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nat Rev Cancer* 2 [9], pp. 647-56.
- [71] Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004): Cell death: critical control points, *Cell* 116 [2], pp. 205-19.
- [72] Borner, C. (2003): The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions, *Mol Immunol* 39 [11], pp. 615-47.
- [73] Chen, L.; Willis, S. N.; Wei, A.; Smith, B. J.; Fletcher, J. I.; Hinds, M. G.; Colman, P. M.; Day, C. L.; Adams, J. M. and Huang, D. C. (2005): Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function, *Mol Cell* 17 [3], pp. 393-403.
- [74] Fanidi, A.; Harrington, E. A. and Evan, G. I. (1992): Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes, *Nature* 359 [6395], pp. 554-6.
- [75] Eischen, C. M.; Roussel, M. F.; Korsmeyer, S. J. and Cleveland, J. L. (2001): Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis, *Mol Cell Biol* 21 [22], pp. 7653-62.
- [76] Egle, A.; Harris, A. W.; Bouillet, P. and Cory, S. (2004): Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [16], pp. 6164-9.
- [77] Sturm, I.; Stephan, C.; Gillissen, B.; Siebert, R.; Janz, M.; Radetzki, S.; Jung, K.; Loening, S.; Dorken, B. and Daniel, P. T. (2006): Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma, *Cell Death Differ* 13 [4], pp. 619-27.
- [78] Hasenjager, A. (2005): Mechanisms of apoptosis induction by the proapoptotic protein Smac/DIABLO, PhD Thesis, Freie Universität Berlin.
- [79] Galonek, H. L. and Hardwick, J. M. (2006): Upgrading the BCL-2 network, *Nat Cell Biol* 8 [12], pp. 1317-9.
- [80] Juin, P.; Cartron, P. F. and Vallette, F. M. (2005): Activation of Bax by BH3 domains during apoptosis: the unfolding of a deadly plot, *Cell Cycle* 4 [5], pp. 637-42.
- [81] Letai, A.; Bassik, M. C.; Walensky, L. D.; Sorcinelli, M. D.; Weiler, S. and Korsmeyer, S. J. (2002): Distinct BH3 domains either sensitize or activate mi-

- tochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics, *Cancer Cell* 2 [3], pp. 183-92.
- [82] Willis, S. N.; Fletcher, J. I.; Kaufmann, T.; van Delft, M. F.; Chen, L.; Czabotar, P. E.; Ierino, H.; Lee, E. F.; Fairlie, W. D.; Bouillet, P.; Strasser, A.; Kluck, R. M.; Adams, J. M. and Huang, D. C. (2007): Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak, *Science* 315 [5813], pp. 856-9.
- [83] Er, E.; Oliver, L.; Cartron, P. F.; Juin, P.; Manon, S. and Vallette, F. M. (2006): Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax, *Biochim Biophys Acta* 1757 [9-10], pp. 1301-11.
- [84] Yang, J.; Liu, X.; Bhalla, K.; Kim, C. N.; Ibrado, A. M.; Cai, J.; Peng, T. I.; Jones, D. P. and Wang, X. (1997): Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked, *Science* 275 [5303], pp. 1129-32.
- [85] Shi, Y. (2006): Mechanical aspects of apoptosome assembly, *Curr Opin Cell Biol* 18 [6], pp. 677-84.
- [86] Riedl, S. J. and Shi, Y. (2004): Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 [11], pp. 897-907.
- [87] Shi, Y. (2004): Caspase activation: revisiting the induced proximity model, *Cell* 117 [7], pp. 855-8.
- [88] Oltersdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dinges, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Kitada, S.; Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettesheim, D. G.; Ng, S.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W. and Rosenberg, S. H. (2005): An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature* 435 [7042], pp. 677-81.
- [89] Bech-Otschir, D.; Kapelari, B. and Dubiel, W. (2005): *The COP9 signalosome: Its Possible Role in the Ubiquitin System*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.
- [90] te Poele, R. H.; Okorokov, A. L. and Joel, S. P. (1999): RNA synthesis block by 5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) triggers p53-dependent apoptosis in human colon carcinoma cells, *Oncogene* 18 [42], pp. 5765-72.
- [91] Henke, W.; Ferrell, K.; Bech-Otschir, D.; Seeger, M.; Schade, R.; Jungblut, P.; Naumann, M. and Dubiel, W. (1999): Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome lid', *Mol. Biol. Rep.* 26 [1-2], pp. 29-34.
- [92] Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R. E.; Cosentino, L. M.; Ballas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I. S. and Lee, K. H. (1994): Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids, *J. Nat. Prod.* 57 [2], pp. 243-7.
- [93] Safayhi, H. and Sailer, E. R. (1997): Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes, *Planta Med* 63 [6], pp. 487-93.
- [94] Schuhly, W.; Heilmann, J.; Calis, I. and Sticher, O. (1999): New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*, *Planta Med* 65 [8], pp. 740-3.

- [95] Ogura, M.; Cordell, G. A.; Kinghorn, A. D. and Farnsworth, N. R. (1977): Potential anticancer agents vi. Constituents of *Ailanthus excelsa* (Simaroubaceae), *Lloydia* 40 [6], pp. 579-84.
- [96] Eiznhamer, D. A. and Xu, Z. Q. (2004): Betulinic acid: a promising anticancer candidate, *IDrugs* 7 [4], pp. 359-73.
- [97] Fulda, S.; Friesen, C.; Los, M.; Scaffidi, C.; Mier, W.; Benedict, M.; Nunez, G.; Krammer, P. H.; Peter, M. E. and Debatin, K. M. (1997): Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors, *Cancer Res.* 57 [21], pp. 4956-64.
- [98] Juin, P.; Geneste, O.; Raimbaud, E. and Hickman, J. A. (2004): Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer, *Biochim Biophys Acta* 1644 [2-3], pp. 251-60.
- [99] Kutzki, O.; Park, H. S.; Ernst, J. T.; Orner, B. P.; Yin, H. and Hamilton, A. D. (2002): Development of a potent Bcl-x(L) antagonist based on alpha-helix mimicry, *J Am Chem Soc* 124 [40], pp. 11838-9.
- [100] Wang, J. L.; Liu, D.; Zhang, Z. J.; Shan, S.; Han, X.; Srinivasula, S. M.; Croce, C. M.; Alnemri, E. S. and Huang, Z. (2000): Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [13], pp. 7124-9.
- [101] Degterev, A.; Lugovskoy, A.; Cardone, M.; Mulley, B.; Wagner, G.; Mitchison, T. and Yuan, J. (2001): Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL, *Nat Cell Biol* 3 [2], pp. 173-82.
- [102] Kitada, S.; Leone, M.; Sareth, S.; Zhai, D.; Reed, J. C. and Pellecchia, M. (2003): Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins, *J Med Chem* 46 [20], pp. 4259-64.
- [103] Birge, R. R. (1990): Nature of the primary photochemical events in rhodopsin and bacteriorhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta* 1016 [3], pp. 293-327.
- [104] Hayashi, S.; Tajkhorshid, E. and Schulten, K. (2003): Molecular dynamics simulation of bacteriorhodopsin's photoisomerization using ab initio forces for the excited chromophore, *Biophys. J.* 85 [3], pp. 1440-49.
- [105] Borisenko, V.; Burns, D. C.; Zhang, Z. H. and Woolley, G. A. (2000): Optical switching of ion-dipole interactions in a gramicidin channel analogue, *Journal of the American Chemical Society* 122 [27], pp. 6364-6370.
- [106] Behrendt, R.; Renner, C.; Schenk, M.; Wang, F. Q.; Wachtveitl, J.; Oesterhelt, D. and Moroder, L. (1999): Photomodulation of the conformation of cyclic peptides with azobenzene moieties in the peptide backbone, *Angewandte Chemie-International Edition* 38 [18], pp. 2771-2774.
- [107] Willner, I. and Rubin, S. (1996): Control of the structure and functions of biomaterials by light, *Angewandte Chemie-International Edition in English* 35 [4], pp. 367-385.
- [108] Steinle, W. and Ruck-Braun, K. (2003): Synthesis and characterization of novel bifunctional hemithioindigo chromophores, *Organic Letters* 5 [2], pp. 141-144.

- [109] Herre, S.; Schadendorf, T.; Ivanov, I.; Herrberger, C.; Steinle, W.; Ruck-Braun, K.; Preissner, R. and Kuhn, H. (2006): Photoactivation of an inhibitor of the 12/15-lipoxygenase pathway, *Chembiochem* 7 [7], pp. 1089-95.
- [110] Hert, J.; Willett, P.; Wilton, D. J.; Acklin, P.; Azzaoui, K.; Jacoby, E. and Schuffenhauer, A. (2004): Comparison of fingerprint-based methods for virtual screening using multiple bioactive reference structures, *J Chem Inf Comput Sci* 44 [3], pp. 1177-85.
- [111] Carhart, R.E.; Smith, D.H. and Venkataraghavan, R. (1985): Atom pairs as molecular features in structure-activity studies: definition and applications, *J Chem Inf Comput Sci* 25 [2], pp. 64-73.
- [112] Willet, P.; Winterman, V. and Bawden, D. (1986): Implementation of nearest-neighbor searching in an online chemical structure search system, *J Chem Inf Comput Sci* 26 [1], pp. 36-41.
- [113] Willet, P.; Barnard, J.M. and Downs, G.M. (1998): Chemical Similarity Searching, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 38, pp. 983-996.
- [114] Sheridan, R. P. and Kearsley, S. K. (2002): Why do we need so many chemical similarity search methods?, *Drug Discov Today* 7 [17], pp. 903-11.
- [115] Johnson, M.A.; Maggiora, G.M. and Eds. (1990): *Concepts and Applications of Molecular Similarity*, pp. Wiley: New York, 1990.
- [116] <http://www.mdli.com/> Molecular Design Limited (MDL): <http://www.mdli.com/>, Molecular Design Limited (MDL).
- [117] Whittle, M.; Willett, P.; Klaffke, W. and van Noort, P. (2003): Evaluation of similarity measures for searching the dictionary of natural products database, *J Chem Inf Comput Sci* 43 [2], pp. 449-57.
- [118] Discovery Studio, Accelrys: <http://www.accelrys.com/dstudio>.
- [119] Bajorath, J. (2001): Selected concepts and investigations in compound classification, molecular descriptor analysis, and virtual screening, *J Chem Inf Comput Sci* 41 [2], pp. 233-45.
- [120] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W. and Feeney, P. J. (1997): Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, pp. 3-25.
- [121] Oprea, T. I. (2000): Property distribution of drug-related chemical databases, *J Comput Aided Mol Des* 14 [3], pp. 251-64.
- [122] van De Waterbeemd, H.; Smith, D. A.; Beaumont, K. and Walker, D. K. (2001): Property-based design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics, *J Med Chem* 44 [9], pp. 1313-33.
- [123] Hansch, C. and Fujita, T. (1964): *ae-oe-Analysis*. A method for the correlation of biological activity and chemical structure, *J Am Chem Soc* 86 [8], pp. 1616-1626.
- [124] Hansch, C.; Maolney, P.P.; Fujita, T. and Muir, R.M. (1962): Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with hammett substituent constants and partition coefficient, *Nature* 194 [4824], pp. 178-180.

- [125] Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W. and Taylor, R. D. (2003): Improved protein-ligand docking using GOLD, *Proteins* 52 [4], pp. 609-23.
- [126] Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V. and Mee, R. P. (1997): Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes, *J Comput Aided Mol Des* 11 [5], pp. 425-45.
- [127] CCDC Scientific Frequently Asked Questions, http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/faqs/scientific_faq.php.
- [128] Gibas, C. and Jambeck, P. (2001): Kapitel 14: Visualisierung und Data Mining, Einführung in die Praktische Bioinformatik. Grundlagen, Anwendungen, Techniken, und Tools.
- [129] Gombar, V. K.; Enslein, K. and Blake, B. W. (1995): Assessment of developmental toxicity potential of chemicals by quantitative structure-toxicity relationship models, *Chemosphere* 31 [1], pp. 2499-510.
- [130] Groettrup, M.; Ständera, S.; Stohwasser, R. and Kloetzel, P. M. (1997): The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [17], pp. 8970-5.
- [131] Fulda, S.; Meyer, E.; Friesen, C.; Susin, S. A.; Kroemer, G. and Debatin, K. M. (2001): Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis, *Oncogene* 20 [9], pp. 1063-75.
- [132] Stone, K. R.; Mickey, D. D.; Wunderli, H.; Mickey, G. H. and Paulson, D. F. (1978): Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145), *Int J Cancer* 21 [3], pp. 274-81.
- [133] Zhang, L.; Yu, J.; Park, B. H.; Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2000): Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents, *Science* 290 [5493], pp. 989-92.
- [134] Scherer, W. F.; Syverton, J. T. and Gey, G. O. (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix, *J Exp Med* 97 [5], pp. 695-710.
- [135] Schneider, U.; Schwenk, H. U. and Bornkamm, G. (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma, *Int J Cancer* 19 [5], pp. 621-6.
- [136] Walker, J. M. (1994): The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation, *Methods Mol Biol* 32, pp. 5-8.
- [137] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [259], pp. 680-5.
- [138] Raynal, P. and Pollard, H. B. (1994): Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins, *Biochim Biophys Acta* 1197 [1], pp. 63-93.
- [139] Liu, R.; Hsieh, C. Y. and Lam, K. S. (2004): New approaches in identifying drugs to inactivate oncogene products, *Semin. Cancer Biol.* 14 [1], pp. 13-21.

- [140] Kast, W. M.; Offringa, R.; Peters, P. J.; Voordouw, A. C.; Meloen, R. H.; van der Eb, A. J. and Melief, C. J. (1989): Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes, *Cell* 59 [4], pp. 603-14.
- [141] Shieh, D. E.; Chen, Y. Y.; Yen, M. H.; Chiang, L. C. and Lin, C. C. (2004): Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells, *Life Sci* 74 [18], pp. 2279-90.
- [142] Lontas, A. and Yeger, H. (2004): Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma, *Anticancer Res.* 24 [2B], pp. 987-98.
- [143] Youssef, K. M. and El-Sherbeny, M. A. (2005): Synthesis and antitumor activity of some curcumin analogs, *Arch. Pharm. (Weinheim)* 338 [4], pp. 181-9.
- [144] Adams, B. K.; Cai, J.; Armstrong, J.; Herold, M.; Lu, Y. J.; Sun, A.; Snyder, J. P.; Liotta, D. C.; Jones, D. P. and Shoji, M. (2005): EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism, *Anticancer Drugs* 16 [3], pp. 263-75.
- [145] Fullbeck, M.; Huang, X.; Dumdey, R.; Frommel, C.; Dubiel, W. and Preissner, R. (2005): Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells, *BMC Cancer* 5, p. 97.
- [146] Klopfer, A.; Hasenjager, A.; Belka, C.; Schulze-Osthoff, K.; Dorken, B. and Daniel, P. T. (2004): Adenine deoxynucleotides fludarabine and cladribine induce apoptosis in a CD95/Fas receptor, FADD and caspase-8-independent manner by activation of the mitochondrial cell death pathway, *Oncogene* 23 [58], pp. 9408-18.
- [147] Wieder, T.; Prokop, A.; Bagci, B.; Essmann, F.; Bernicke, D.; Schulze-Osthoff, K.; Dorken, B.; Schmalz, H. G.; Daniel, P. T. and Henze, G. (2001): Piceatanol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts, *Leukemia* 15 [11], pp. 1735-42.
- [148] von Haefen, C.; Wieder, T.; Essmann, F.; Schulze-Osthoff, K.; Dorken, B. and Daniel, P. T. (2003): Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop, *Oncogene* 22 [15], pp. 2236-47.
- [149] Gillissen, B.; Essmann, F.; Graupner, V.; Starck, L.; Radetzki, S.; Dorken, B.; Schulze-Osthoff, K. and Daniel, P. T. (2003): Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway, *Embo J* 22 [14], pp. 3580-90.
- [150] Scholz, C.; Richter, A.; Lehmann, M.; Schulze-Osthoff, K.; Dorken, B. and Daniel, P. T. (2005): Arsenic trioxide induces regulated, death receptor-independent cell death through a Bcl-2-controlled pathway, *Oncogene* 24 [47], pp. 7031-42.
- [151] Scholz, C.; Wieder, T.; Starck, L.; Essmann, F.; Schulze-Osthoff, K.; Dorken, B. and Daniel, P. T. (2005): Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway, *Oncogene* 24 [11], pp. 1904-13.

- [152] Sattler, M.; Liang, H.; Nettesheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Shuker, S. B.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; Thompson, C. B. and Fesik, S. W. (1997): Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis, *Science* 275 [5302], pp. 983-6.
- [153] Füllbeck, M; Michalsky, E.; Jaeger, I.S.; Henklein, P.; Kuhn, H.; Ruck-Braun, K. and Preissner, R. (2006): Design and Biological Evaluation of Photo-Switchable Inhibitors, *Genome Informatics* 17 [2], pp. 141-151.
- [154] Jenkins, J. L.; Kao, R. Y. and Shapiro, R. (2003): Virtual screening to enrich hit lists from high-throughput screening: a case study on small-molecule inhibitors of angiogenin, *Proteins* 50 [1], pp. 81-93.
- [155] Stahura, F. L. and Bajorath, J. (2004): Virtual screening methods that complement HTS, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 7 [4], pp. 259-69.
- [156] Graham, D. L.; Bevan, N.; Lowe, P. N.; Palmer, M. and Rees, S. (2001): Application of beta-galactosidase enzyme complementation technology as a high throughput screening format for antagonists of the epidermal growth factor receptor, *J. Biomol. Screen.* 6 [6], pp. 401-11.
- [157] Yim, H.; Lee, Y. H.; Lee, C. H. and Lee, S. K. (1999): Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor, *Planta Med* 65 [1], pp. 9-13.
- [158] Sarno, S.; Moro, S.; Meggio, F.; Zagotto, G.; Dal Ben, D.; Ghisellini, P.; Battistutta, R.; Zanotti, G. and Pinna, L. A. (2002): Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors, *Pharmacol. Ther.* 93 [2-3], pp. 159-68.
- [159] Noble, M. E.; Endicott, J. A. and Johnson, L. N. (2004): Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure, *Science* 303 [5665], pp. 1800-5.
- [160] Li, L.; Aggarwal, B. B.; Shishodia, S.; Abbruzzese, J. and Kurzrock, R. (2004): Nuclear factor-kappaB and IkappaB kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis, *Cancer* 101 [10], pp. 2351-62.
- [161] Sharma, R. A.; Gescher, A. J. and Steward, W. P. (2005): Curcumin: the story so far, *Eur J Cancer* 41 [13], pp. 1955-68.
- [162] Füllbeck, M; Preissner, R.; Dubiel, W. and Frömmel, C. (2005): Neues Mittel zur Tumorsuppression und Hemmung der Tumorangiogenese, Deutschland, Charite - Universitätsmedizin Berlin, 29.06.2005, DE 10 2004 063 269 3
- [163] Shibue, T. and Taniguchi, T. (2006): BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis, *Int J Cancer* 119 [9], pp. 2036-43.
- [164] Creagh, E. M.; Murphy, B. M.; Duriez, P. J.; Duckett, C. S. and Martin, S. J. (2004): Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins, *J Biol Chem* 279 [26], pp. 26906-14.
- [165] Willis, S. N.; Chen, L.; Dewson, G.; Wei, A.; Naik, E.; Fletcher, J. I.; Adams, J. M. and Huang, D. C. (2005): Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins, *Genes Dev* 19 [11], pp. 1294-305.

- [166] Hasenjager, A.; Gillissen, B.; Muller, A.; Normand, G.; Hemmati, P. G.; Schuler, M.; Dorken, B. and Daniel, P. T. (2004): Smac induces cytochrome c release and apoptosis independently from Bax/Bcl-x(L) in a strictly caspase-3-dependent manner in human carcinoma cells, *Oncogene* 23 [26], pp. 4523-35.
- [167] Wendt, J.; von Haefen, C.; Hemmati, P.; Belka, C.; Dorken, B. and Daniel, P. T. (2005): TRAIL sensitizes for ionizing irradiation-induced apoptosis through an entirely Bax-dependent mitochondrial cell death pathway, *Oncogene* 24 [25], pp. 4052-64.
- [168] von Haefen, C.; Gillissen, B.; Hemmati, P. G.; Wendt, J.; Guner, D.; Mrozek, A.; Belka, C.; Dorken, B. and Daniel, P. T. (2004): Multidomain Bcl-2 homolog Bax but not Bak mediates synergistic induction of apoptosis by TRAIL and 5-FU through the mitochondrial apoptosis pathway, *Oncogene* 23 [50], pp. 8320-32.
- [169] Rudner, J.; Jendrossek, V.; Lauber, K.; Daniel, P. T.; Wesselborg, S. and Belka, C. (2005): Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis -- results from dose-response studies, *Oncogene* 24 [1], pp. 130-40.
- [170] Marini, P.; Denzinger, S.; Schiller, D.; Kauder, S.; Welz, S.; Humphreys, R.; Daniel, P. T.; Jendrossek, V.; Budach, W. and Belka, C. (2006): Combined treatment of colorectal tumours with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR1 and HGS-ETR2 and radiotherapy: enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo, *Oncogene* 25 [37], pp. 5145-54.
- [171] Fulda, S.; Jeremias, I. and Debatin, K. M. (2004): Cooperation of betulinic acid and TRAIL to induce apoptosis in tumor cells, *Oncogene* 23 [46], pp. 7611-20.
- [172] Eskes, R.; Desagher, S.; Antonsson, B. and Martinou, J. C. (2000): Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane, *Mol Cell Biol* 20 [3], pp. 929-35.
- [173] Chandra, D.; Choy, G.; Daniel, P. T. and Tang, D. G. (2005): Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2, *J Biol Chem* 280 [19], pp. 19051-61.
- [174] Aiken, C. and Chen, C. H. (2005): Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals, *Trends Mol. Med.* 11 [1], pp. 31-6.
- [175] Chandramu, C.; Manohar, R. D.; Krupadanam, D. G. and Dashavantha, R. V. (2003): Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L, *Phytother. Res.* 17 [2], pp. 129-34.
- [176] Knorr, R. and Hamburger, M. (2004): Quantitative analysis of anti-inflammatory and radical scavenging triterpenoid esters in evening primrose oil, *J. Agric Food Chem.* 52 [11], pp. 3319-24.
- [177] Steele, J. C.; Warhurst, D. C.; Kirby, G. C. and Simmonds, M. S. (1999): In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial, *Phytother. Res.* 13 [2], pp. 115-9.
- [178] Burlacu, A. (2003): Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, *J Cell Mol Med* 7 [3], pp. 249-57.
- [179] Reed, J. C. (2006): Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities, *Cell Death Differ* 13 [8], pp. 1378-86.

- [180] Karst, A. M. and Li, G. (2007): BH3-only proteins in tumorigenesis and malignant melanoma, *Cell Mol Life Sci* 64 [3], pp. 318-30.
- [181] Wang, S.; Yang, D. and Lippman, M. E. (2003): Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists, *Semin Oncol* 30 [5 Suppl 16], pp. 133-42.
- [182] Reed, J. C. (1997): Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer, *Adv Pharmacol* 41, pp. 501-32.
- [183] Martin, Y. C.; Kofron, J. L. and Traphagen, L. M. (2002): Do structurally similar molecules have similar biological activity?, *J Med Chem* 45 [19], pp. 4350-8.
- [184] Sharpe, J. C.; Arnoult, D. and Youle, R. J. (2004): Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members, *Biochim. Biophys. Acta* 1644 [2-3], pp. 107-13.
- [185] Kelekar, A. and Thompson, C. B. (1998): Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis, *Trends Cell Biol* 8 [8], pp. 324-30.
- [186] Cheng, E. H.; Kirsch, D. G.; Clem, R. J.; Ravi, R.; Kastan, M. B.; Bedi, A.; Ueno, K. and Hardwick, J. M. (1997): Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases, *Science* 278 [5345], pp. 1966-8.
- [187] Goldsmith, K. C.; Liu, X.; Dam, V.; Morgan, B. T.; Shabbout, M.; Cnaan, A.; Letai, A.; Korsmeyer, S. J. and Hogarty, M. D. (2006): BH3 peptidomimetics potently activate apoptosis and demonstrate single agent efficacy in neuroblastoma, *Oncogene*.
- [188] Walensky, L. D.; Kung, A. L.; Escher, I.; Malia, T. J.; Barbuto, S.; Wright, R. D.; Wagner, G.; Verdine, G. L. and Korsmeyer, S. J. (2004): Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix, *Science* 305 [5689], pp. 1466-70.
- [189] Vuorelaa, P.; Leinonenb, M.; Saikkuc, P.; Tammela, P.; Rauhad, J. P.; Wennberge, T. and Vuorela, H. (2004): Natural products in the process of finding new drug candidates, *Curr. Med. Chem.* 11 [11], pp. 1375-89.
- [190] Tulp, M. and Bohlin, L. (2005): Rediscovery of known natural compounds: Nuisance or goldmine?, *Bioorg. Med. Chem.* 13 [17], pp. 5274-82.
- [191] Piggott, A. M. and Karuso, P. (2004): Quality, not quantity: the role of natural products and chemical proteomics in modern drug discovery, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 7 [7], pp. 607-30.
- [192] Feher, M. and Schmidt, J. M. (2003): Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43 [1], pp. 218-27.
- [193] Newman, D. J.; Cragg, G. M. and Snader, K. M. (2003): Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, *J. Nat. Prod.* 66 [7], pp. 1022-37.
- [194] Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2004): Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials, *J Nat Prod* 67 [8], pp. 1216-38.
- [195] Wessjohann, L. A.; Ruijter, E.; Garcia-Rivera, D. and Brandt, W. (2005): What can a chemist learn from nature's macrocycles?--a brief, conceptual view, *Mol. Divers.* 9 [1-3], pp. 171-86.

- [196] Koehn, F. E. and Carter, G. T. (2005): The evolving role of natural products in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 [3], pp. 206-20.
- [197] Fullbeck, M.; Michalsky, E.; Dunkel, M. and Preissner, R. (2006): Natural products: sources and databases, *Nat Prod Rep* 23 [3], pp. 347-56.
- [198] Fang, X.; Shao, L.; Zhang, H. and Wang, S. (2005): CHMIS-C: a comprehensive herbal medicine information system for cancer, *J. Med. Chem.* 48 [5], pp. 1481-8.
- [199] Lei, J. and Zhou, J. (2002): A marine natural product database, *J Chem Inf Comput Sci* 42 [3], pp. 742-8.
- [200] Qiao, X.; Hou, T.; Zhang, W.; Guo, S. and Xu, X. (2002): A 3D structure database of components from Chinese traditional medicinal herbs, *J Chem Inf Comput Sci* 42 [3], pp. 481-9.
- [201] Dunkel, M.; Fullbeck, M.; Neumann, S. and Preissner, R. (2006): SuperNatural: a searchable database of available natural compounds, *Nucleic Acids Res* 34 [Database issue], pp. D678-83.
- [202] Csizmadia, F. (2000): JChem: Java applets and modules supporting chemical database handling from web browsers, *J Chem Inf Comput Sci* 40 [2], pp. 323-4.
- [203] Goede, A.; Dunkel, M.; Mester, N.; Frommel, C. and Preissner, R. (2005): SuperDrug: a conformational drug database, *Bioinformatics* 21 [9], pp. 1751-3.
- [204] WHO (2003): The selection and use of essential medicines. Report of the WHO Expert Committee, 2002 (including the 12th Model list of essential medicines), *World Health Organ Tech Rep Ser* 914, pp. i-vi, 1-126.
- [205] Butler, M.S. (2005): Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials, *Nat Prod Red* 22 [2], pp. 162-95.
- [206] Gabai, VL; Budagova, KR and Sherman, MY (2005): Increased expression of the major heat shock protein HSP72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents., *Oncogene* 24 [20], pp. 3328-38.
- [207] Koivusalo, R; Krausz, E; Helenius, H and Hietanen, S (2005): Chemotherapy Compounds in Cervical Cancer Cells Primed by Reconstruction of p53 Function after Short Interfering RNA-Mediated Degradation of Human Papillomavirus 18 E6 mRNA: Opposite Effect of siRNA in Combination with Different Drugs., *Mol Pharmacol.* 68 [2], pp. 372-82.
- [208] Ismail, M.; Henklein, P.; Huang, X.; Braumann, C.; Ruckert, R. I. and Dubiel, W. (2006): Identification of HIV-1 Tat peptides for future therapeutic angiogenesis, *Eur J Haematol* 77 [2], pp. 157-65.

ANHANG

Name	IC ₅₀ -Wert [µM]	Hersteller
Curcumin-ähnlich		
Curcumin	2,6	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
BN_11264	> 1000	Analyticon, Potsdam, Deutschland
BN_11270	> 1000	Analyticon, Potsdam, Deutschland
BN_13078	> 1000	Analyticon, Potsdam, Deutschland
BN_13088	> 1000	Analyticon, Potsdam, Deutschland
BN_13172	> 1000	Analyticon, Potsdam, Deutschland
BTB00363	188,6	Maybridge, Tintagel, England
Formoterol	853,94	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Piceatannol	1,7	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
RDR01042	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
Resveratrol	32,1	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
RJC03322	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
S00677	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
S00686	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
S09268	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
SEW0556	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
SEW0597	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
SPB02119	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
SPB03645	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
Emodin-ähnlich		
Emodin	4,4	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland

BTB10218	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
BTB14162	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
BTB14431	21.0	Maybridge, Tintagel, England
BTB14660	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
BTB15203	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
DP01776	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
GK01212	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
JFD00841	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
JFD00850	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
JFD02836	54,1	Maybridge, Tintagel, England
JFD03520	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
JFD03665	19,8	Maybridge, Tintagel, England
KM07482	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
RJC01815	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
RJC03864	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
RJC03871	> 1000	Maybridge, Tintagel, England
SEW04213	4,8	Maybridge, Tintagel, England

Tabelle 20: 35 Treffer des in silico Screenings mit Curcumin und Emodin.

Datenbank (Anbieter)	Anzahl der Moleküle	Anzahl der Konformere
Rote Liste	3 200	20 000
Cambridge	250 000	7 500 000
NCI	240 000	9 000 000
Maybridge	65 000	1 700 000
IBS	250 000	7 500 000
Enamine	300 000	8 000 000
Asinex	190 000	5 000 000
Analyticon	15 000	400 000
ComGenex	160 000	4 900 000
Ambinter	420 000	10 400 000
CMC Datenbank	7 500	200 000
Chembridge	228 000	5 100 000
Tripos	85 000	1 800 000
Pharmeks	84 000	1 900 000
CAP-Complete (Accelrys)	1 619 612	77 582 740
Gesamt	3 667 312	141 002 740

NCI: National Cancer Institute, IBS: InterBioScreen, CMC: Comprehensive Medicinal Chemistry, CAP: Compounds Available for Purchase

Tabelle 21: Datenbank, die für die in silico Screenings verwendet wurde.

Angegeben sind der Name der Datenbank bzw. des Anbieters, Anzahl der Strukturen und die Anzahl der berechneten Konformere.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir durch ihre Mithilfe bei der Erstellung dieser Arbeit eine große Unterstützung waren.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Cornelius Frömmel bedanken, der mir, durch die vertrauensvolle Aufnahme in sein Institut, die Gelegenheit gab an sehr interessanten Themen zu arbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Robert Preissner bedanken. Besonders danke ich ihm für die vertrauensvolle Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die fachkundige, geduldige und stets gut gelaunte Betreuung. Durch ihn hatte ich die Möglichkeit viele interessante Projekte erfolgreich durchzuführen und er stand mir stets mit Rat und Tat betreuend zur Seite.

Einen besonderen Dank schulde ich auch Prof. Peter Daniel, in dessen Arbeitsgruppe ich den größten Teil meiner zellbiologischen Untersuchungen durchgeführt habe. Zahlreiche fachliche Anregungen und Diskussionen haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Wolfgang Dubiel bedanke ich mich ebenfalls für die vertrauensvolle Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die stets fachkundige Unterstützung bei meinen Projekten.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitglieder der Arbeitsgruppen, in denen ich während meiner Doktorandenzeit gearbeitet habe. Die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Insbesondere gilt mein Dank Ines Jäger, die mir stets als Freundin und Kollegin zur Seite stand. Gleiches gilt für Elke Michalsky, die außerdem das Modell für die schaltbare Helix erstellt hat und die als Badminton-Partnerin für den sportlichen Ausgleich sorgte. Renate Dumdey möchte ich für die exzellente Hilfe bei experimentellen Problemen danken sowie Antje und Anja Richter für die Durchführung der Westernblot Analyse und die fachkundige und geduldige Hilfe bei allen Fragen. Danken möchte ich auch allen anderen wunderbaren Kollegen, die mir diese drei Jahre zu unvergesslichen Jahren gemacht haben: Mathias Dunkel, Stefan Günther, Julia Hossbach, Dr. Stephan Lorenzen, Armin Weiser, Dr. Ralph Kuban, Dr. Peter Hildebrand, Dr.

Andrean Goede und alle anderen aus den Arbeitsgruppen von PD Dr. Robert Preissner, Prof. Peter Daniel und Prof. Wolfgang Dubiel.

Und nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, meiner Schwester Kerstin und allen Freunden für ihre fortwährende Unterstützung im Leben außerhalb der Wissenschaft.

LEBENS LAUF

Name: Melanie Füllbeck

Geburtsdatum: 09.06.1978

Geburtsort: Schwelm

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

08/1984 – 07/1988 Grundschule Haßlinghausen

08/1988 – 07/1997 Städtisches Gymnasium Gevelsberg
Abschluss: Abitur

10/1997 – 01/2003 Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität
Giessen.
Schwerpunkte: Biochemie, Genetik, Mikrobiologie
Abschluss: Diplom-Biologin
Diplomarbeit am Institut für Biochemie
bei Prof. Dr. A. Pingoud
Thema: „Charakterisierung der Bindungsregion des
Nukleaseinhibitors NuiA aus *Anabaena sp.*“

- 10/2002 – 02/2004 Aufbaustudium im Fach Bioinformatik an der Technischen Fachhochschule Berlin.
- Abschluss: Master of Computer Science in Bioinformatics
- Masterarbeit am Institut für Biochemie, Charité, Berlin
- Thema: "Theoretische Vorhersage und experimentelle Validierung von Kinase-Inhibitoren"
-
- 03/2004 – heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie (CCM) und Institut für Molekularbiologie und Bioinformatik (CBF), Charité, Berlin

EIGENE PUBLIKATIONEN

Melanie Füllbeck, Xiaohua Huang, Renate Dumdey, Cornelius Frömmel, Wolfgang Dubiel, Robert Preissner: **Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells.** *BMC Cancer* 2005, 5:97.

Mathias Dunkel*, **Melanie Füllbeck***, Stefanie Neumann, Robert Preissner: **SuperNatural: a searchable database of available natural compounds.** *Nucleic Acids Research* 2006, 34:D678-83

* Gleichberechtigte Erstautoren

Melanie Füllbeck, Elke Michalsky, Mathias Dunkel, Robert Preissner: **Natural products: sources and databases.** *Natural Product Reports* 2006, 23:347-356

Melanie Füllbeck, Elke Michalsky, Ines S. Jäger, Peter Henklein, Hartmut Kühn, Karola Rück-Braun, Robert Preissner: **Design and Biological Evaluation of Photo-Switchable Inhibitors.** *Genome Informatics* 2006, 17 (2): 141-151

Patent:

Neues Mittel zur Tumorsuppression und Hemmung der Tumorangiogenese

Inventor: **Füllbeck Melanie** (DE), Preissner Robert (DE), Dubiel Wolfgang (DE), Frömmel Cornelius (DE)

Patent number: DE 10 2004 063 269 3 Publication Date: 2005-06-29

Applicant: Charite - Universitätsmedizin Berlin (DE)

Vorträge:

In silico Screening for Signalosome Inhibitors, ZOMES III, 05/2004, Berlin

Synergy of in silico and in vitro screening, Practical Approaches in Computational Biology, 09/2005, Opatija, Kroatien

Round table Chairman:

Topic: SuperNatural: A searchable database for purchasable natural compounds, Natural Products in Drug Discovery and Development II, 06/2006, London, UK

Design and biological evaluation of photoswitchable inhibitors, IRTG, Genomics and Systems Biology of Molecular Networks, 07/2006, Boston, USA

Poster:

In silico Screening for Signalosome Inhibitors, German Conference on Bioinformatics, 10/2003, München

Neue Medikamente aus dem Rechner, Lange Nacht der Wissenschaften, 06/2005, Berlin

Superficial-detecting potential protein binding sites via structure based surface simulation, Practical Approaches in Computational Biology, 09/2005, Opatija, Kroatien

SuperNatural: A Database of available natural compounds, ChemBioNet, 12/2005, Frankfurt

Konferenzteilnahmen:

Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 09/2001, Bochum

German Conference on Bioinformatics (GCB), 10/2003, München

ZOMES III: The COP9 Signalosome, Proteasome and eIF3: at the interface between signalling and proteolysis, 05/2004, Berlin

Practical Approaches in Computational Biology (PACB), 09/2005, Opatija, Kroatien

ChemBioNet, Chemical Biology in Germany: Meeting Europe, 12/2005 Frankfurt

Sixth International Conference on Genome Informatics, International Research Training Group (IRTG), Genomics and Systems Biology of Molecular Networks, 07/2006, Boston, USA

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.
Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Melanie Füllbeck

Juli 2007